

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/EP05/002454

International filing date: 04 March 2005 (04.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: US  
Number: 60/549,980  
Filing date: 05 March 2004 (05.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 18 May 2005 (18.05.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

PA 1264714



# THE UNITED STATES OF AMERICA

**TO ALL TO WHOM THESE PRESENTS SHALL COME:**

**UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE**

**United States Patent and Trademark Office**

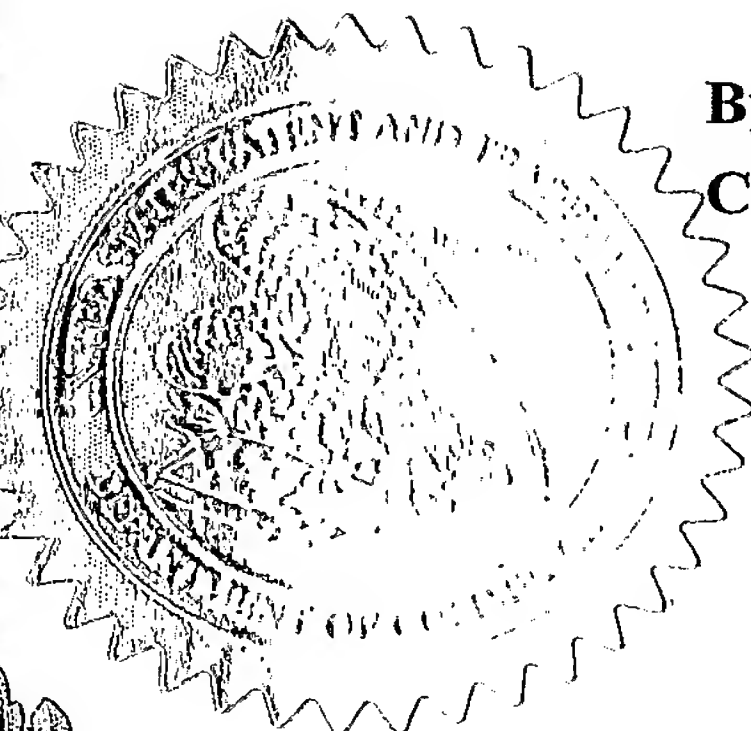
**December 28, 2004**

**THIS IS TO CERTIFY THAT ANNEXED HERETO IS A TRUE COPY FROM  
THE RECORDS OF THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK  
OFFICE OF THOSE PAPERS OF THE BELOW IDENTIFIED PATENT  
APPLICATION THAT MET THE REQUIREMENTS TO BE GRANTED A  
FILING DATE UNDER 35 USC 111.**

**APPLICATION NUMBER: 60/549,980**

**FILING DATE: March 05, 2004**

**By Authority of the  
COMMISSIONER OF PATENTS AND TRADEMARKS**



*Trudie Wallace*  
**TRUDIE WALLACE**  
**Certifying Officer**

Attorney Docket Number: 65084.000006

Please type a plus sign (+) inside this box →

+

# PROVISIONAL APPLICATION FOR PATENT COVER SHEET

MAIL STOP PROVISIONAL PATENT APPLICATION

COMMISSIONER OF PATENTS

P.O. Box 1450

ALEXANDRIA, VA 22313-1450

THIS IS A REQUEST FOR FILING A PROVISIONAL APPLICATION FOR PATENT UNDER 37 C.F.R. § 1.53(c).

## INVENTOR(S)/APPLICANT(S)

Given Name (first and middle (if any))	Family Name or Surname	Residence (City and Either State or Foreign Country)
Claus	FROHBERG	Kleinmachnow, Germany
Oliver	KOETTING	Berlin, Germany
Gerhard	RITTE	Postdam, Germany
Martin	STEUP	Berlin, Germany

Additional inventors are being named on page 2 attached hereto.

## TITLE OF THE INVENTION (280 characters max)

PROCEDURE FOR THE IDENTIFICATION OF PROTEINS WITH STRENGTH OF PHOSPHORYLIERENDER ENZYMATIC ACTIVITY

## CORRESPONDENCE ADDRESS

Please Direct All Correspondence To:

<input checked="" type="checkbox"/> Customer No.	21967				
<input type="checkbox"/> Firm Name	Hunton & Williams LLP				
Attorney of Record	Robert M. Schulman, Esq.				
Address	Intellectual Property Department				
	1900 K Street, N.W., Suite 1200				
City	Washington	State	DC	Zip Code	20006-1109
Country	U.S.A.	Telephone	202-955-1500	Facsimile	202-778-2201

## ENCLOSED APPLICATION PARTS (check all that apply)

<input checked="" type="checkbox"/> Specification	Number of Pages	143	<input type="checkbox"/> Small Entity Status Claimed As:
<input checked="" type="checkbox"/> Drawing(s)	Number of Sheets	5	<input type="checkbox"/> Other (specify) _____

## METHOD OF PAYMENT OF FILING FEE FOR THIS PROVISIONAL APPLICATION

A check in the amount of ☒ \$ 160.00 ☐ \$ 80.00 is enclosed to cover the filing fee. The Commissioner is hereby authorized to charge any variance between the amount enclosed and the Patent Office charges to Deposit Account No. 50-0206

☒ The Commissioner is hereby authorized to charge the \$ \_\_\_\_\_ filing fee or credit any overpayment to Deposit Account No. 50-0206.

The invention was made by an agency of the United States Government or under a contract with an agency of the United States Government.

☒ No.  
☐ Yes, the name of the U.S. Government agency and the Government contract number are: \_\_\_\_\_

Respectfully submitted,

By

Jeffrey T. Perez

Date

March 5, 2004

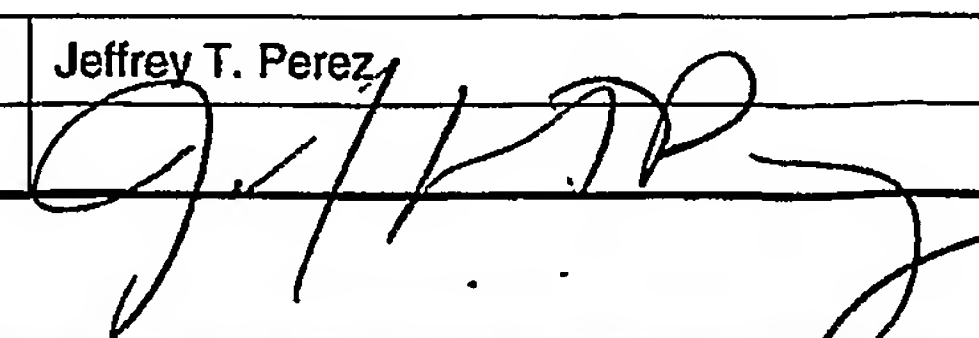
Telephone

(202) 955-1902

Registration No.

52,110



<b>FEE TRANSMITTAL</b>  <b>MAIL STOP Provisional Patent Application</b>		<i>Complete If Known</i>																																							
		Application No.		Not yet assigned																																					
		Filing Date		March 5, 2004																																					
		First Named Inventor		FROHBERG, et al.																																					
		Examiner Name		Not yet assigned																																					
		Group Art Unit		Unknown																																					
Total Amount Of Payment (\$)		160		Attorney Docket No.		65084.000006																																			
<b>METHOD OF PAYMENT (check one)</b>				<b>FEE CALCULATION (continued)</b>																																					
1. <input checked="" type="checkbox"/> The Commissioner for Patents is hereby authorized to charge indicated fees and credit any over payments to <b>Deposit Account No. 50-0206</b> in the name of Hunton & Williams LLP.				3. <b>ADDITIONAL FEES</b>																																					
				<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="text-align: left;">Fee Description</th> <th style="text-align: right;">Fee Paid</th> </tr> <tr><td><input type="checkbox"/> Surcharge - late filing fee or oath</td><td style="text-align: right;">\$</td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/> Surcharge - late provisional filing fee or cover sheet</td><td style="text-align: right;">\$</td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/> _____ Month Extension of Time</td><td style="text-align: right;">\$</td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/> Notice of Appeal</td><td style="text-align: right;">\$</td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/> Filing Brief in Support of Appeal</td><td style="text-align: right;">\$</td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/> Request for Oral Hearing</td><td style="text-align: right;">\$</td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/> Utility Issue Fee (or Reissue) (including Publication Fee, if necessary)</td><td style="text-align: right;">\$</td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/> Design Issue Fee</td><td style="text-align: right;">\$</td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/> Plant Issue Fee</td><td style="text-align: right;">\$</td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/> Petition to Commissioner</td><td style="text-align: right;">\$</td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/> Petition to Revive (Unavoidable)</td><td style="text-align: right;">\$</td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/> Petition to Revive (Unintentional)</td><td style="text-align: right;">\$</td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/> Petitions Related to Provisional Applications</td><td style="text-align: right;">\$</td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/> Submission of Information Disclosure Statement</td><td style="text-align: right;">\$</td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/> Filing Submission After Final Rejection</td><td style="text-align: right;">\$</td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/> Recording Each Patent Assignment Per Property</td><td style="text-align: right;">\$</td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/> Filing Request for Reexamination</td><td style="text-align: right;">\$</td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/> Other (specify) _____</td><td style="text-align: right;">\$</td></tr> </table>				Fee Description	Fee Paid	<input type="checkbox"/> Surcharge - late filing fee or oath	\$	<input type="checkbox"/> Surcharge - late provisional filing fee or cover sheet	\$	<input type="checkbox"/> _____ Month Extension of Time	\$	<input type="checkbox"/> Notice of Appeal	\$	<input type="checkbox"/> Filing Brief in Support of Appeal	\$	<input type="checkbox"/> Request for Oral Hearing	\$	<input type="checkbox"/> Utility Issue Fee (or Reissue) (including Publication Fee, if necessary)	\$	<input type="checkbox"/> Design Issue Fee	\$	<input type="checkbox"/> Plant Issue Fee	\$	<input type="checkbox"/> Petition to Commissioner	\$	<input type="checkbox"/> Petition to Revive (Unavoidable)	\$	<input type="checkbox"/> Petition to Revive (Unintentional)	\$	<input type="checkbox"/> Petitions Related to Provisional Applications	\$	<input type="checkbox"/> Submission of Information Disclosure Statement	\$	<input type="checkbox"/> Filing Submission After Final Rejection	\$	<input type="checkbox"/> Recording Each Patent Assignment Per Property	\$
Fee Description	Fee Paid																																								
<input type="checkbox"/> Surcharge - late filing fee or oath	\$																																								
<input type="checkbox"/> Surcharge - late provisional filing fee or cover sheet	\$																																								
<input type="checkbox"/> _____ Month Extension of Time	\$																																								
<input type="checkbox"/> Notice of Appeal	\$																																								
<input type="checkbox"/> Filing Brief in Support of Appeal	\$																																								
<input type="checkbox"/> Request for Oral Hearing	\$																																								
<input type="checkbox"/> Utility Issue Fee (or Reissue) (including Publication Fee, if necessary)	\$																																								
<input type="checkbox"/> Design Issue Fee	\$																																								
<input type="checkbox"/> Plant Issue Fee	\$																																								
<input type="checkbox"/> Petition to Commissioner	\$																																								
<input type="checkbox"/> Petition to Revive (Unavoidable)	\$																																								
<input type="checkbox"/> Petition to Revive (Unintentional)	\$																																								
<input type="checkbox"/> Petitions Related to Provisional Applications	\$																																								
<input type="checkbox"/> Submission of Information Disclosure Statement	\$																																								
<input type="checkbox"/> Filing Submission After Final Rejection	\$																																								
<input type="checkbox"/> Recording Each Patent Assignment Per Property	\$																																								
<input type="checkbox"/> Filing Request for Reexamination	\$																																								
<input type="checkbox"/> Other (specify) _____	\$																																								
2. <input checked="" type="checkbox"/> Check Enclosed. The Commissioner for Patents is hereby authorized to charge any variance between the amount enclosed and the Patent Office charges to <b>Deposit Account No. 50-0206</b> in the name of Hunton & Williams LLP, 1900 K Street, N.W., Suite 1200, Washington, D.C. 20006-1109.																																									
<b>FEE CALCULATION</b>																																									
1. <b>BASIC FILING FEE</b> <input checked="" type="checkbox"/> Large Entity <input type="checkbox"/> Small Entity																																									
				<b>FEE PAID</b>																																					
Utility Filing Fee				\$																																					
Design Filing Fee				\$																																					
Plant Filing Fee				\$																																					
Reissue Filing Fee				\$																																					
Provisional Filing Fee				\$ <b>160.00</b>																																					
2. <b>EXTRA CLAIMS FEES</b>																																									
<b>CLAIMS AS AMENDED</b>																																									
For	Number Present	Highest Number Paid For	Extra	Rate		Amount																																			
				Large Entity	Small Entity																																				
TOTAL CLAIMS		20	0	x \$ 18.00	x \$ 9.00	\$ 0.00																																			
INDEPENDENT CLAIMS		3	0	x \$ 86.00	x \$ 43.00	\$ 0.00																																			
MULTIPLE DEPENDENT CLAIMS				\$ 290.00	\$ 145.00	\$ 0.00																																			
<b>TOTAL EXTRA CLAIMS FEES</b>						<b>\$ 0.00</b>																																			
SUBMITTED BY						Complete (if applicable)																																			
Typed or Printed Name		Jeffrey T. Perez			Registration No.		52,110																																		
Signature					Date		March 5, 2004																																		



Bayer CropScience GmbH

**Verfahren zur Identifizierung von Proteinen mit Stärke**  
**5 phosphorylierender enzymatischer Aktivität**

***Beschreibung***

Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren zur Identifizierung von Proteinen die an  
10 der Phosphorylierung von Stärke beteiligt sind, sowie Nucleinsäuren, die solche  
Proteine codieren. Ferner betrifft die vorliegende Erfindung Pflanzenzellen und  
Pflanzen, die eine erhöhte Aktivität eines mit den erfindungsgemäßen Verfahren  
identifizierbaren Proteins aufweisen. Solche Pflanzenzellen und Pflanzen  
synthetisieren eine modifizierte Stärke. Die vorliegende Erfindung betrifft daher auch  
15 die von den erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und Pflanzen synthetisierte Stärke  
sowie Verfahren zur Herstellung dieser Stärke, als auch die Herstellung von  
Stärkederivaten dieser modifizierten Stärke.

Im Hinblick auf die zunehmende Bedeutung, die pflanzlichen Inhaltsstoffen als  
20 erneuerbaren Rohstoffquellen zur Zeit beigemessen wird, ist es eine der Aufgaben  
der biotechnologischen Forschung, sich um eine Anpassung dieser pflanzlichen  
Rohstoffe an die Anforderungen der verarbeitenden Industrie zu bemühen. Um eine  
Anwendung von nachwachsenden Rohstoffen in möglichst vielen Einsatzgebieten zu  
ermöglichen, ist es darüber hinaus erforderlich, eine große Stoffvielfalt zu erreichen.

Das Polysaccharid Stärke ist aus chemisch einheitlichen Grundbausteinen, den Glucosemolekülen, aufgebaut, stellt jedoch ein komplexes Gemisch unterschiedlicher Molekülformen dar, die Unterschiede hinsichtlich des Polymerisations- und des Verzweigungsgrades aufweisen und sich somit in ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften stark voneinander unterscheiden. Man differenziert zwischen Amylosestärke, einem im wesentlichen unverzweigten Polymer aus alpha-1,4-glycosidisch verknüpften Glucoseeinheiten, und der Amylopektinstärke, einem verzweigten Polymer, bei dem die Verzweigungen durch das Auftreten zusätzlicher alpha-1,6-glycosidischer Verknüpfungen zustande kommen. Ein weiterer wesentlicher Unterschied zwischen Amylose und Amylopektin liegt im Molekulargewicht. Während Amylose, je nach Herkunft der Stärke, ein Molekulargewicht von  $5 \times 10^5 - 10^6$  Da besitzt, liegt das des Amylopektins zwischen  $10^7$  und  $10^8$  Da. Die beiden Makromoleküle können durch ihr Molekulargewicht und ihre unterschiedlichen physiko-chemischen Eigenschaften differenziert werden, was am einfachsten durch ihre unterschiedlichen Jodbindungseigenschaften sichtbar gemacht werden kann.

Amylose wurde lange als lineares Polymer, bestehend aus alpha-1,4-glycosidisch verknüpften alpha-D-Glucose-Monomeren, angesehen. In neueren Studien wurde jedoch die Anwesenheit von alpha-1,6-glycosidischen Verzweigungspunkten (ca. 0,1%) nachgewiesen (Hizukuri und Takagi, Carbohydr. Res. 134, (1984), 1-10; Takeda et al., Carbohydr. Res. 132, (1984), 83-92).

Die funktionellen Eigenschaften, wie z.B. die Löslichkeit, das Retrogradationsverhalten, das Wasserbindevermögen, die Filmbildungseigenschaften, die Viskosität, die Verkleisterungseigenschaften, die Gefrier-Tau-Stabilität, die Säurestabilität, die Gelfestigkeit, die Stärkekorngröße von Stärken werden neben dem Amylose/Amylopektin-Verhältnis beeinflusst durch das Molekulargewicht, das Muster der Seitenkettenverteilung, den Gehalt an Ionen, den Lipid- und Proteingehalt, die mittlere Stärkekorngröße die Stärkekornmorphologie

etc.. Die funktionellen Eigenschaften von Stärke werden auch vom Phosphatgehalt, einer nicht-Kohlenstoffkomponente von Stärke, beeinflusst. Dabei ist zwischen Phosphat, welches in Form von Monoestern kovalent an die Glucosemoleküle der Stärke gebunden ist (im Folgenden als Stärkephosphat bezeichnet) und Phosphat  
5 in Form von mit der Stärke assoziierten Phospholipiden zu unterscheiden. Der Einfluss auf die funktionellen Eigenschaften der Stärke ist dabei neben dem Phosphatgehalt auch Abhängig von der Form, (Stärkephosphat oder Phospholipide) in welcher das Phosphat in der Stärke vorliegt (Jane et al., 1996, Cereal Foods World 41 (11), 827-832).

10

Der Gehalt an Stärkephosphat variiert je nach Pflanzensorte. So synthetisieren z.B. bestimmte Maismutanten eine Stärke mit erhöhtem Gehalt an Stärkephosphat (waxy-Mais 0,002% und Hoch-Amylose-Mais 0,013%), während herkömmliche Mais Sorten nur Spuren von Stärkephosphat aufweisen. Ebenfalls geringe Mengen an  
15 Stärkephosphat findet man in Weizen (0,001%) während in Hafer und Sorghum kein Stärkephosphat nachgewiesen werden konnte. In Reis-Mutanten wurde ebenfalls weniger Stärkephosphat gefunden (waxy-Reis 0,003%), als in herkömmlichen Reissorten (0,013%). Signifikante Mengen von Stärkephosphat wurden in Knollen- oder Wurzelspeichestärke synthetisierenden Pflanzen wie z.B. Tapioca (0,008%),  
20 Süßkartoffel (0,011%), Pfeilwurz (0,021%) oder Kartoffel (0,089%) nachgewiesen. Die im Vorangegangenen zitierten prozentualen Werte für den Stärkephosphatgehalt beziehen sich jeweils auf das Trockengewicht der Stärke und sind von Jane et al. (1996, Cereal Foods World 41 (11), 827-832) ermittelt worden.

25 Stärkephosphat kann in Form von Monoestern an der C-2-, C-3- oder C-6-Position der polymerisierten Glucosemonomere vorliegen (Takeda und Hizukuri, 1971, Starch/Stärke 23, 267-272). Die Phosphatverteilung des Stärkephosphates in von Pflanzen synthetisierter Stärke zeichnet sich im Allgemeinen dadurch aus, dass etwa 30% bis 40% der Phosphatreste in C-3-Position und etwa 60% bis 70% der  
30 Phosphatreste in C-6-Position der Glucosemoleküle kovalent gebunden sind



(Blennow et al., 2000, Int. J. of Biological Macromolecules 27, 211-218). Blennow et al. (2000, Carbohydrate Polymers 41, 163-174) ermittelten einen Gehalt an Stärkephosphat, der in C-6-Position der Glukosemoleküle gebunden ist, für verschiedene Stärken, wie z.B. Kartoffelstärke (zwischen 7,8 und 33,5 nMol pro mg Stärke, je nach Sorte), Stärke aus verschiedenen *Curcuma* Spezies (zwischen 1,8 und 63 nMol pro mg), Tapiocastärke (2,5 nMol pro mg Stärke), Reisstärke (1,0 nMol pro mg Stärke), Mungbohnenstärke (3,5 nMol pro mg Stärke) und Sorghumstärke (0,9 nMol pro mg Stärke). In Gerstenstärke und Stärke aus verschiedenen waxy-Mutanten von Mais konnten diese Autoren kein an der C-6-Position gebundenes Stärkephosphat nachweisen. Bisher konnte kein Zusammenhang zwischen dem Genotyp einer Pflanze und dem Gehalt von Stärkephosphat hergestellt werden (Jane et al., 1996, Cereal Foods World 41 (11), 827-832). Daher ist es zur Zeit nicht möglich, den Gehalt an Stärkephosphat in Pflanzen durch züchterische Maßnahmen zu beeinflussen.

15

In transgenen Pflanzen konnte die Menge an Stärkephosphat in Speicherstärken verändert werden. So zeigt Speicherstärke aus Kartoffelpflanzen, die eine reduzierte Aktivität einer löslichen Stärkesynthase III (Abel et al., 1996, The Plant Journal 10(6), 9891-991), eines Verzweigungsenzyms I (BEI) (Safford et al., 1998, Carbohydrate Polymers 35, 155-168), eines Verzweigungsenzyms II (BEII) (Jobling et al., 1999, The Plant Journal 18, 163-171), eines BEI und eines BEII (Schwall et al., 2000, Nature Biotechnology 18, 551- 554), eines Disproportionierungsenzyms (WO 96 27673) oder eines Disproportionierungsenzyms und eines BEI (WO 95 07355) aufweisen, gegenüber Stärke aus entsprechenden Wildtyp-Pflanzen einen gesteigerten Gehalt an Stärkephosphat. Die Reduktion des Gehaltes an Stärkephosphat in diesen Pflanzen beruht jedoch nicht darauf, dass die Proteine, deren Aktivität in diesen Pflanzen reduziert ist, direkt an der Einführung von Phosphatresten in die Stärke beteiligt sind. Die Steigerung des Gehaltes von Stärkephosphat in den betreffenden transgenen Pflanzen ist daher kein primärer, sondern ein sekundärer Effekt, der durch Reduzierung der entsprechenden Proteine

hervorgerufen wird. Die Ursache für die Steigerung des Gehaltes an Stärkephosphat durch Veränderung der genannten Proteinaktivitäten ist bisher noch ungeklärt. Daher ist eine gezielte Veränderung des Gehaltes an Stärkephosphat durch Veränderung von Proteinaktivitäten, welche nur durch einen sekundären Effekt den Gehalt an  
5 Stärkephosphat beeinflussen, nicht möglich. Weiterhin bewirkt die Veränderung der Aktivitäten von Proteinen, die als sekundären Effekt einen Einfluss auf den Gehalt von Stärkephosphat in Pflanzen haben, gleichzeitig auch weitere Veränderungen der Stärke, wie z.B. Veränderung des Amylose/Amylopektin Verhältnisses und/oder der Länge der Seitenketten des Amylopektins, welche den primären Effekt der  
10 Veränderungen solcher Proteinaktivitäten darstellt.

Bisher ist nur ein Protein beschrieben, welches die Einführung von kovalenten Bindungen von Phosphatresten an die Glucosemoleküle der Stärke vermittelt. Dieses Protein, in der wissenschaftlichen Literatur häufig als R1 bezeichnet, ist an die  
15 Stärkekörner der Speicherstärke in Kartoffelknollen gebunden (Lorberth et al., 1998, Nature Biotechnology 16, 473-477) und hat die enzymatische Aktivität einer alpha-Glucan-Wasser-Dikinase (E.C. 2.7.9.4). In der von R1 katalysierten Reaktion werden die Edukte alpha-1,4-Glucan (Stärke), Adenosintriphosphat (ATP) und Wasser zu den Produkten Glucan-Phosphat (phosphorylierte Stärke), Monophosphat und  
20 Adenosinmonophosphat umgesetzt. Dabei wird der gamma-Phosphatrest des ATP auf Wasser und der beta-Phosphatrest des ATP auf das Glucan (Stärke) übertragen. R1 überträgt *in vitro* den beta-Phosphatrest von ATP auf die C-6 und die C-3 Position der Glucosemoleküle von alpha-1,4-Glucanen. Das Verhältnis von C-6-Phosphat zu C-3 Phosphat, welches bei der *in vitro* Reaktion erhalten wird, entspricht dem  
25 Verhältnis, welches in Stärke, isoliert aus Pflanzen, vorliegt (Ritte et al., 2002, PNAS 99, 7166-7171). Da das Stärkephosphat in Kartoffelstärke zu etwa 70% in C-6-Position und zu etwa 30% in C-3-Position der Glucosemonomere der Stärke gebunden vorliegt, bedeutet dies, dass R1 bevorzugt die C-6-Position der Glucosemoleküle phosphoryliert. Weiterhin ist für R1 u.a. durch Verwendung von  
30 Amylopektin aus Mais gezeigt worden, dass es alpha-1,4-Glucane phosphorylieren

kann, welche noch kein kovalent gebundenes Phosphat enthalten (Ritte et al., 2002, PNAS 99, 7166-7171), d.h. R1 ist in der Lage, Phosphat *de novo* in alpha-1,4-Glucane einführen.

Die Aminosäuresequenz von R1 enthält eine Domäne, die zu Domänen von  
5 bekannten Pyruvat-Phosphat-Dikinasen (PPDK-Domäne) und bekannten Pyruvat-Wasser-Dikinasen (PPS-Domäne) einen hohen Grad an Homologie aufweist und einen in PPDK- und PPS-Domänen konservierten Histidinrest beinhaltet. Bei der Übertragung von Phosphatresten des ATP auf alpha-1,4-Glucane (Stärke) entsteht als Zwischenprodukt ein phosphoryliertes R1-Protein, wobei ein Phosphatrest  
10 kovalent an den in der PPDK- oder der PPS-Domäne konservierten Histidinrest gebunden vorliegt (Mikkelsen et al., 2004, Biochemical Journal 377, 525-532).

Nukleinsäuresequenzen und zu diesen korrespondierende Aminosäuresequenzen, codierend ein R1 Protein sind aus unterschiedlichen Spezies, wie z.B. Kartoffel (WO 97 11188, GenBank Acc.: AY027522, Y09533), Weizen (WO 00 77229, US  
15 6,462,256, GenBank Acc.: AAN93923, GenBank Acc.: AR236165), Reis (GenBank Acc.: AAR61445, GenBank Acc.: AR400814), Mais (GenBank Acc.: AAR61444, GenBank Acc.: AR400813), Soyabohne (GenBank Acc.: AAR61446, GenBank Acc.: AR400815), Citrus (GenBank Acc.: AY094062) und *Arabidopsis* (GenBank Acc.: AF312027) beschrieben.

20

Weizenpflanzen, welche durch Überexpression eines R1 Gens aus Kartoffel eine erhöhte Aktivität eines R1 Proteins aufweisen, sind in WO 02 34923 beschrieben. Diese Pflanzen synthetisieren im Vergleich zu entsprechenden Wildtyp-Pflanzen, in welchen kein Stärkephosphat detektiert werden konnte, eine Stärke mit signifikanten  
25 Mengen an Stärkephosphat in der C-6-Position der Glucosemoleküle.

Weitere Proteine, die eine Reaktion katalysieren, welche kovalent gebundene Phosphatgruppen in die Stärke einführen, sind bisher nicht beschrieben. Auch Enzyme, die bevorzugt Phosphatgruppen in C-3-Position und/oder C-2-Position der



Glucosemoleküle von Stärke einführen, sind nicht bekannt. Damit stehen abgesehen von der Erhöhung des Gehaltes an Stärkephosphat in Pflanzen auch keine Möglichkeiten zur Verfügung, die Phosphorylierung von Stärke in Pflanzen gezielt zu beeinflussen, die Phosphatverteilung innerhalb der von Pflanzen synthetisierten  
5 Stärke zu verändern und/oder den Gehalt an Stärkephosphat weiter zu erhöhen.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zu Grunde, Verfahren und Mittel zur Erzeugung von Pflanzen, die eine modifizierte Stärke mit erhöhtem Phosphatgehalt und/oder veränderter Phosphatverteilung sowie Pflanzenzellen  
10 und/oder Pflanzen, die eine solche modifizierte Stärke synthetisieren zur Verfügung zu stellen.

Diese Aufgabe wird durch die in den Ansprüchen bezeichneten Ausführungsformen gelöst.

15

Somit betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Identifizierung eines Proteins, welches eine erhöhte Bindungsaktivität gegenüber phosphorylierten alpha-1,4-Glucanen, im Vergleich zu nicht phosphorylierten alpha-1,4-Glucanen aufweist, worin

20 a) Proteinextrakte in voneinander getrennten Ansätzen mit

- i phosphorylierten alpha-1,4-Glucanen und
- ii nicht phosphorylierten alpha-1,4-Glucanen

inkubiert werden,

b) spezifisch an die

25 i phosphorylierten-alpha-1,4-Glucane aus Schritt a) i gebundene Proteine und

- ii nicht-phosphorylierten-alpha-1,4-Glucane aus Schritt a) ii gebundene Proteine

in getrennten Ansätzen voneinander in Lösung gebracht werden und

- c) Proteine identifiziert werden, die eine erhöhte Bindungsaktivität gegenüber phosphorylierten alpha-1,4-Glucanen, verwendet in Schritt b) i, im Vergleich zu nicht phosphorylierten alpha-1,4-Glucanen, verwendet in Schritt b) ii, aufweisen.

In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Identifizierung eines Proteins, welches eine erhöhte Bindungsaktivität gegenüber P-alpha-1,4-Glucanen, im Vergleich zu nicht-phosphorylierten-alpha-1,4-Glucanen aufweist, handelt es sich bei dem alpha-1,4-Glucan, zu welchem eine höhere Bindungsaktivität besteht, um Stärke, bevorzugt um granuläre Stärke.

Eine weitere Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Identifizierung eines Proteins, welches eine erhöhte Bindungsaktivität gegenüber P-alpha-1,4-Glucanen, im Vergleich zu nicht-phosphorylierten-alpha-1,4-Glucanen aufweist, betrifft ein Verfahren zur Identifizierung eines Proteins, das ein von der Aminosäuresequenz abgeleitetes Molekulargewicht von 120 kDa bis 145 kDa, bevorzugt von 120 kDa bis 140 kDa, besonders bevorzugt von 125 kDa bis 140 kDa, insbesondere bevorzugt von 130 kDa bis 135 kDa aufweist.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Identifizierung eines Proteins, welches eine erhöhte Bindungsaktivität gegenüber P-alpha-1,4-Glucanen, im Vergleich zu nicht-phosphorylierten-alpha-1,4-Glucanen aufweist, worin die Bindungsaktivität zu P-alpha-1,4-Glucanen mindestens 3-fach, 5 bevorzugt mindestens 4-fach, besonders bevorzugt mindestens 5-fach und insbesondere bevorzugt mindestens 6-fach erhöht ist im Vergleich zur Bindungsaktivität zu nicht-phosphorylierten-alpha-1,4-Glucanen.

Die Menge an Protein welche an P-alpha-1,4-Glucose bzw. nicht-phosphorylierte-alpha-1,4-Glucose bindet, kann beispielsweise bestimmt werden durch immunologische Methoden wie Western-Blot-Analyse, ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) oder RIA (Radio Immune Assay).

Methoden zur Herstellung von Antikörpern, die spezifisch mit einem bestimmten Protein reagieren, d.h. die spezifisch an besagtes Protein binden, sind dem Fachmann bekannt (siehe z.B. Lottspeich und Zorbas (Eds.), 1998, Bioanalytik, Spektrum akad, Verlag, Heidelberg, Berlin, ISBN 3-8274-0041-4). Die Herstellung solcher Antikörper wird von einigen Firmen (z.B. Eurogentec, Belgien) als Auftragservice angeboten. Eine Möglichkeit zur Herstellung von Antikörpern, die mit einem OK1 Protein spezifisch reagieren, ist weiter unten beschrieben (siehe Beispiel 11 ).

Durch Vergleich der bei Durchführung erfindungsgemäßer Verfahren zur Identifizierung eines Proteins, welches eine erhöhte Bindungsaktivität gegenüber P-alpha-1,4-Glucanen im Vergleich zu nicht-phosphorylierten-alpha-1,4-Glucanen aufweist, erhaltenen in Lösung gebrachten P-alpha-1,4Glucan-bindenden-Proteine mit den erhaltenen in Lösung gebrachten nicht-phosphorylierte-alpha-1,4-Glucan-bindenden-Proteine, können Proteine identifiziert werden, die eine erhöhte



Bindungsaktivität gegenüber P-alpha-1,4-Glucanen im Vergleich zu nicht-phosphorylierten-alpha-1,4-Glucanen aufweisen.

In einer weiteren Ausführungsform erfindungsgemäßer Verfahren zur Identifizierung  
5 eines Proteins, welches eine erhöhte Bindungsaktivität gegenüber phosphorylierten  
alpha-1,4-Glucanen, im Vergleich zu nicht phosphorylierten alpha-1,4-Glucanen  
aufweist, werden die durch Inkubation von Proteinextrakten mit P-alpha-1,4-  
Glucanen nach Schritt a) i erhaltenen P-alpha-1,4-Glucan-Protein-Komplexe und die  
durch Inkubation von Proteinextrakten mit nicht-phosphorylierten-alpha-1,4-Glucanen  
10 nach Schritt a) ii erhaltenen nicht-phosphorylierten-alpha-1,4-Glucan-Protein-  
Komplexe von den nicht an die betreffenden alpha-1,4-Glucose gebundenen  
Proteinen getrennt. Die Trennung findet dabei für die jeweiligen Inkubationslösungen  
nach Verfahrensschritt a) i bzw. nach Verfahrensschritt a) ii separat statt.

15 In einer weiteren Ausführungsform erfindungsgemäßer Verfahren zur Identifizierung  
eines Proteins, welches eine erhöhte Bindungsaktivität gegenüber phosphorylierten  
alpha-1,4-Glucanen, im Vergleich zu nicht-phosphorylierten-alpha-1,4-Glucanen  
aufweist, werden die nach Schritt b) i bzw. b) ii in Lösung gebrachten Proteine von  
den in erfindungsgemäßen Verfahren nach Schritt a) i bzw. Schritt a) ii eingesetzten  
20 alpha-1,4-Glucanen abgetrennt.

Bei den nach erfindungsgemäßer Verfahren zur Identifizierung eines Proteins,  
welches eine erhöhte Bindungsaktivität gegenüber phosphorylierten alpha-1,4-  
Glucanen, im Vergleich zu nicht phosphorylierten alpha-1,4-Glucanen aufweist,  
25 erhaltenen nach Verfahrensschritt b) i in Lösung gebrachten Proteinen kann es sich  
entweder um ein einziges oder um mehrere Proteine handeln. Auch bei den nach  
Verfahrensschritt b) ii in Lösung gebrachten Proteinen kann es sich entweder um ein  
einziges oder um mehrere Proteine handeln. Sollte es sich bei den in Lösung

gebrachten P-alpha-1,4-Glucan-bindenden-Proteinen bzw. bei den in Lösung gebrachten nicht-phosphorylierte-alpha-1,4-Glucane-bindenden-Proteinen jeweils um mehrere unterschiedliche Proteine handeln, werden diese gegebenenfalls voneinander getrennt werden.

5

In einer weiteren Ausführungsform, erfindungsgemäßer Verfahren zur Identifizierung eines Proteins, welches eine erhöhte Bindungsaktivität gegenüber phosphorylierten alpha-1,4-Glucanen, im Vergleich zu nicht phosphorylierten alpha-1,4-Glucanen aufweist, werden die bei Durchführung erfindungsgemäßer Verfahren die nach  
10 Verfahrensschritt b) i in Lösung gebrachten P-alpha-1,4-Glucane-bindenden-Proteine bzw. die nach Verfahrensschritt b) ii in Lösung gebrachten nicht-phosphorylierte-alpha-1,4-Glucane-bindenden-Proteine, voneinander getrennt.

Die Auftrennung der in Lösung gebrachten P-alpha-1,4-Glucane-bindenden-Proteine bzw. der in Lösung gebrachten nicht-phosphorylierte-alpha-1,4-Glucane-bindenden-  
15 Proteine, kann mit Hilfe von dem Fachmann bekannten Methoden, wie z.B. Gelfiltration, chromatographische Verfahren, Elektrophorese etc. erfolgen. Bevorzugt werden die in Lösung gebrachten P-alpha-1,4-Glucane bindenden Proteine bzw. die in Lösung gebrachten nicht-phosphorylierte-alpha-1,4-Glucane bindenden Proteine mittels SDS-Acrylamidgelelektrophorese, besonders bevorzugt mit der weiter unten  
20 (siehe Allgemeine Methoden 9) beschriebenen Methode voneinander getrennt.

Weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Identifizierung eines Proteins, dass eine alpha-1,4-Glucan phosphorylierende enzymatische Aktivität aufweist und phosphorylierte alpha-1,4-Glucane als Substrat benötigt, worin

- 25 a) Proteinextrakte mit phosphorylierten-alpha-1,4-Glucanen inkubiert werden,  
b) spezifisch an die phosphorylierten-alpha-1,4-Glucane aus Schritt a) gebundene Proteine in Lösung gebracht werden,  
c) Proteine erhalten nach Schritt b) jeweils mit

- i) ATP und phosphorylierten alpha-1,4-Glucanen und
  - ii) ATP und nicht-phosphorylierten-alpha-1,4-Glucanen
- in voneinander getrennten Ansätzen inkubiert werden,
- d) das nach Inkubation in Schritt c) i bzw. c) ii erhaltene jeweilige alpha-1,4-Glucan
- 5 auf Einführung weiterer Phosphatgruppen hin untersucht wird und
- e) Proteine, identifiziert werden, die im Inkubationsansatz nach c) i signifikante Mengen an Phosphatgruppen in alpha-1,4-Glucane eingeführt haben und im Inkubationsansatz nach c) ii keine signifikanten Mengen an Phosphatgruppen in alpha-1,4-Glucane eingeführt haben.

10

Unter dem Begriff „erhöhte Bindungsaktivität“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung, eine erhöhte Affinität eines Proteins zu einem ersten Substrat im Vergleich zu einem zweiten Substrat verstanden werden. D.h., dass die Menge an Protein, die unter gleichen Inkubationsbedingungen vermehrt an ein erstes

15 Substrat im Vergleich zu einem zweiten Substrat bindet, eine erhöhte Bindungsaktivität zu dem ersten Substrat aufweist.

Unter dem Begriff „alpha-1,4-Glucan“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ein Glucan verstanden werden, welches hauptsächlich aus alpha-1,4-verknüpften Glucosebausteinen besteht, jedoch auch alpha-1,6-Verknüpfungen als Verzweigungen enthalten kann. Bevorzugt enthält ein alpha-1,4-Glucan bis zu 15%,

20 besonders bevorzugt bis zu 10% und insbesondere bevorzugt bis zu 5% an alpha-1,6-Verknüpfungen.

25 Unter dem Begriff „Stärkephosphat“ sollen im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung kovalent an die Glucosemoleküle eines alpha-1,4-Glucans gebundene Phosphatgruppen verstanden werden.



Unter dem Begriff „nicht-phosphoryliertes-alpha-1,4-Glucan“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ein alpha-1,4-Glucan verstanden werden, welches keine nachweisbaren Mengen an Stärkephosphat enthält.

- 5 Unter dem Begriff „phosphoryliertes-alpha-1,4-Glucan“ oder „P-alpha-1,4-Glucan“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ein alpha-1,4-Glucan verstanden werden, welches Stärkephosphat enthält.

- Grundsätzlich kann ein Protein, identifizierbar mit einem erfindungsgemäßen  
10 Verfahren aus jedem Organismus stammen. Vorzugsweise stammt das Protein aus pflanzlichen Organismen, bevorzugt aus Stärke speichernden Pflanzen (Mais, Reis, Weizen, Roggen, Hafer, Gerste, Maniok, Kartoffel, Süsskartoffel, Sago, Mungbohne, Banane, Erbse, *Arabidopsis*, *Curcuma* oder Sorghum), besonders bevorzugt aus Kartoffel-, Gerste-, Zuckerrüben- *Arabidopsis*- oder Reispflanzen und insbesondere  
15 bevorzugt *Arabidopsis*- oder Reispflanzen.

- In einer weiteren Ausführungsform erfindungsgemäßer Verfahren stammen die Proteinextrakte aus eukaryontischen Zellen, bevorzugt aus Pflanzenzellen, besonders bevorzugt aus Zellen von Stärke speichernden (Mais, Reis, Weizen,  
20 Roggen, Hafer, Gerste, Maniok, Kartoffel, Süsskartoffel, Sago, Mungbohne, Banane, Erbse, *Arabidopsis*, *Curcuma* oder Sorghum ) Pflanzen.

- Zur Inkubation von Proteinextrakten mit nicht-phosphorylierten-alpha-1,4-Glucanen sind für die Durchführung erfindungsgemäßer Verfahren grundsätzlich alle nicht-  
25 phosphorylierten-alpha-1,4-Glucane geeignet. Bevorzugt wird eine nicht-phosphorylierte pflanzliche Stärke, besonders bevorzugt Weizenstärke und insbesondere bevorzugt granuläre Blattstärke der *Arabidopsis thaliana* Mutante *sex1-3* (Tien-Shin Yu et al., 2001, Plant Cell 13, 1907-1918) verwendet.

Methoden z.B. zur Isolierung von Stärke aus Pflanzen sind dem Fachmann bekannt. Alle dem Fachmann bekannten Methoden sind grundsätzlich geeignet, um nicht-phosphorylierte-Stärke aus entsprechenden Pflanzenspezies zu isolieren. Bevorzugt wird die weiter unten (siehe Allgemeine Methoden 2) beschriebene Methode zur  
5 Isolierung von nicht-phosphorylierten-alpha-1,4-Glucanen verwendet.

Zur Inkubation von Proteinextrakten mit P-alpha-1,4-Glucanen für die Durchführung erfindungsgemäßer Verfahren sind grundsätzlich alle alpha-1,4-Glucane geeignet, die Stärkephosphat enthalten. Auch chemisch phosphorylierte Stärken können hierbei verwendet werden. Vorzugsweise werden zur Inkubation mit Proteinextrakten  
10 pflanzliche P-alpha-1,4-Glucane eingesetzt, besonders bevorzugt eine nachträglich enzymatisch phosphorylierte pflanzliche Stärke, insbesondere bevorzugt eine nachträglich enzymatisch phosphorylierte pflanzliche granuläre Stärke, die aus einer *sex1-3* Mutante von *Arabidopsis thaliana* isoliert wurde.

Eine nachträgliche enzymatische Phosphorylierung von nicht-phosphorylierten-alpha-1,4-Glucanen kann mit jedem Enzym durchgeführt werden, welches  
15 Phosphatreste durch Einführung von kovalenten Bindungen auf nicht-phosphorylierte-alpha-1,4-Glucane überträgt. Bevorzugt wird hierfür ein Enzym mit der Aktivität einer Wasser-Glucan-Dikinase (R1 Protein, E.C.: 2.7.9.4) verwendet (Ritte et al., 2002, PNAS 99, 7166-7171; Mikkelsen et al., 2004, Biochemical Journal  
20 377, 525-532). Bevorzugt wird für die nachträgliche enzymatische Phosphorylierung von nicht-phosphorylierten-alpha-1,4-Glucanen ein gereinigtes R1 Protein, insbesondere ein durch heterologe Expression in *E. coli* produziertes R1 Protein aus Kartoffel verwendet.

Methoden zur Reinigung eines rekombinant durch Expression in *E. coli* produzierten  
25 R1 Proteins sind z.B. beschrieben bei Ritte et al. (2002, PNAS 99, 7166-7171) und Mikkelsen et al. (2003, Biochemical Journal 377, 525-532).

Bei der Durchführung erfindungsgemäßer Verfahren können durch Inkubation von Proteinextrakten mit P-alpha-1,4-Glucanen und/oder nicht-phosphorylierten-alpha-

1,4-Glucanen durch die Bindung von Proteinen an P-alpha-1,4-Glucane P-alpha-1,4-Glucan-Protein-Komplexe und durch die Bindung von Proteinen an nicht-phosphorylierte-alpha-1,4-Glucane nicht-phosphorylierte-alpha-1,4-Glucan-Protein-Komplexe entstehen.

5

Die bei Durchführung erfindungsgemäßer Verfahren werden die in P-alpha-1,4-Glucan-Protein-Komplexen bzw. nicht-phosphoryliertes-alpha-1,4-Glucan-Protein-Komplexen vorliegenden Proteine erfindungsgemäß in Lösung gebracht, d.h. die Bindung der betreffenden Proteine an die jeweiligen alpha-1,4-Glucane wird  
10 aufgehoben. Damit werden in Lösung gebrachte P-alpha-1,4-Glucane-bindende-Proteine und/oder in Lösung gebrachte nicht-phosphoryliertes-alpha-1,4-Glucan-bindende-Proteine erhalten. Zur Aufhebung der Bindung zwischen den betreffenden alpha-1,4-Glucanen und den an sie gebundenen Proteinen sind grundsätzlich alle Substanzen verwendbar, die die bestehende Protein-alpha-1,4-Glucan Interaktion  
15 unterbinden. Bevorzugt werden dazu Pufferlösungen, enthaltend Detergenzien, besonders bevorzugt Pufferlösungen, enthaltend Natriumlaurylsulfat (SDS), insbesondere bevorzugt die weiter unten beschriebene Pufferlösung (siehe Allgemeine Methoden 8) verwendet.

20 Zur Trennung von alpha-1,4-Glucanen von ATP und/oder Proteinen ist grundsätzlich jede Methode geeignet, die es erlaubt, alpha-1,4-Glucane von den sich in Lösung befindlichen Substanzen, wie Proteine und z.B. ATP, des Inkubationsansatzes zu trennen. Werden für die Inkubation von Proteinextrakten mit alpha-1,4-Glucanen bei der Durchführung erfindungsgemäßer Verfahren lösliche alpha-1,4-Glucane  
25 verwendet, so kann die Trennung z.B. eine Präzipitation der alpha-1,4-Glucane, bevorzugt eine Präzipitation mit geeigneten Lösungsmitteln, besonders bevorzugt eine Präzipitation mit Alkoholen, beinhalten. Auch die Abtrennung von alpha-1,4-Glucanen durch Bindung an Substanzen, die selektiv alpha-1,4-Glucane binden (z.B. Concavalin A) ist zur Durchführung der Trennung von alpha-1,4-Glucanen von sich in  
30 Lösung befindlichen Substanzen, geeignet

Vorzugsweise wird dabei zur Abtrennung der alpha-1,4-Glucane eine Filtration verwendet, besonders bevorzugt eine Zentrifugation, insbesondere bevorzugt die weiter unten beschriebene Methode (siehe Allgemeine Methoden 8) verwendet.

- 5 Bei der Durchführung erfindungsgemäßer Verfahren, können zur Trennung von löslichen Proteinen von den betreffenden alpha-1,4-Glucanen grundsätzlich alle dem Fachmann bekannten Methoden, wie z.B. chromatographische Methoden, Präzipitation und anschließende Zentrifugation des alpha-1,4-Glucans, enzymatischer Verdau der alpha-1,4-Glucane, Gelfiltration etc. verwendet werden,  
10 die zur Trennung von löslichen Proteinen von alpha-1,4-Glucanen führen. Bevorzugt werden die in Lösung gebrachten P-alpha-1,4-Glucane-bindenden-Proteine und/oder in Lösung gebrachten nicht-phosphorylierte-alpha-1,4-Glucane-bindenden-Proteine von den in erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzten alpha-1,4-Glucanen mit Hilfe von Zentrifugation getrennt.

15

In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird bei der Durchführung erfindungsgemäßer Verfahren zur Abtrennung von an P-alpha-1,4-Glucan-Protein-Komplexen von nicht in den betreffenden Komplexen enthaltenen Proteinen eine Zentrifugation unter Verwendung eines Percoll Kissens verwendet.

- 20 Vorzugsweise wird dabei zur Abtrennung der nicht an die alpha-1,4-Glucane gebundenen Proteine die weiter unten beschriebene Methode (siehe Allgemeine Methoden 8) verwendet. Nach erfolgter Zentrifugation unter Verwendung eines Percoll Kissens befinden sich die nicht an P-alpha-1,4-Glucane bzw. nicht an nicht-phosphorylierte-alpha-1,4-Glucane gebundenen Proteine im Überstand des  
25 Zentrifugationsmediums, während die P-alpha-1,4-Glucan-Protein-Komplexe bzw. nicht-phosphoryliertes-alpha-1,4-Glucan-Protein-Komplexe im sedimentierten Pellet vorliegen. Der Überstand des Zentrifugationsmediums wird verworfen, und das Pellet vorzugsweise zur weiteren Aufreinigung der P-alpha-1,4-Glucan-Protein-Komplexe bzw. nicht-phosphoryliertes-alpha-1,4-Glucan-Protein-Komplexe mit dem zur

Inkubation verwendeten Puffer gewaschen. Bevorzugt wird das Pellet einmal, besonders bevorzugt zweimal gewaschen.

Grundsätzlich können zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens zur  
5 Identifizierung eines Proteins, dass eine alpha-1,4-Glucan phosphorylierende  
enzymatische Aktivität aufweist und phosphorylierte alpha-1,4-Glucane als Substart  
benötigt, jegliche Art von Proteinextrakten eingesetzt werden. Es kann sich dabei  
sowohl um so genannte Proteinrohextrakte, als auch um teilweise oder vollständig  
aufgereinigte Proteinextrakte handeln. So ist es z.B. von Vorteil, Proteine  
10 einzusetzen, welche mit einem erfindungsgemäßen Verfahren zur Identifizierung  
eines Proteins, welches eine erhöhte Bindungsaktivität gegenüber phosphorylierten  
alpha-1,4-Glucanen, im Vergleich zu nicht phosphorylierten alpha-1,4-Glucanen  
aufweist, identifiziert wurden. Proteine, welche mit einem erfindungsgemäßen  
Verfahren zur Identifizierung eines Proteins, welches eine erhöhte Bindungsaktivität  
15 gegenüber phosphorylierten alpha-1,4-Glucanen, im Vergleich zu nicht  
phosphorylierten alpha-1,4-Glucanen aufweist, identifiziert wurden, können z.B. unter  
Auslassung der Verfahrensschritte a) und b) direkt in Schritt c) des  
erfindungsgemäßen Verfahrens zur Identifizierung eines Proteins, dass eine alpha-  
1,4-Glucan phosphorylierende enzymatische Aktivität aufweist und phosphorylierte  
20 alpha-1,4-Glucane als Substart benötigt, eingesetzt werden.

Zur Herstellung von Proteinextrakten aus prokaryontischen oder eukaryontischen  
Organismen für die Durchführung erfindungsgemäßer Verfahren, sind grundsätzlich  
alle dem Fachmann bekannten allgemeinen Methoden, wie z.B. bei Scopes (1993,  
25 Protein Purification: Principles & Practice, ISSN: 038794072) beschrieben, geeignet.  
Bevorzugt werden zur Durchführung der Verfahren jedoch Methoden zur Isolierung  
von pflanzlichen Proteinen (z.B. beschrieben bei Bollag et al, 1996, in: „Protein  
Methods“, 2nd Edition, Wiley, ISBN: 0-471-11837-0; Dennison, 2003, in: „A Guide to  
Protein Isolation“ 2nd Edition, Kluwer Academic Publishers, ISBN 1-4020-1224-1),



besonders bevorzugt das weiter unten beschriebene Verfahren (siehe Allgemeine Methoden 1) verwendet.

Die Inkubation der Proteinextrakte zur Durchführung erfindungsgemäßer Verfahren  
5 mit P-alpha-1,4-Glucanen bzw. nicht-phosphorylierten-alpha-1,4-Glucanen findet in  
getrennten Ansätzen statt. Die betreffenden Ansätze für P-alpha-1,4-Glucose bzw.  
nicht-phosphorylierte-alpha-1,4-Glucose werden während der Durchführung des  
gesamten Verfahrens getrennt voneinander behandelt. Dabei sind jeweils gleiche  
Mengen von Proteinextrakt mit jeweils gleichen Mengen an P-alpha-1,4-Glucanen  
10 bzw. nicht-phosphorylierten-alpha-1,4-Glucanen zu inkubieren. Bevorzugt werden  
jeweils 1 bis 10 mg, besonders bevorzugt 3 bis 7 mg und insbesondere bevorzugt 4  
bis 6 mg Proteinextrakt mit P-alpha-1,4-Glucanen bzw. nicht-phosphorylierten-alpha-  
1,4-Glucanen inkubiert. Die Menge der eingesetzten P-alpha-1,4-Glucose, bzw. der  
nicht-phosphorylierten-alpha-1,4-Glucose beträgt bevorzugt jeweils 10 bis 100 mg,  
15 besonders bevorzugt 30 bis 70 mg und insbesondere bevorzugt 45 bis 55 mg.

Für die Inkubation von Proteinextrakten mit P-alpha-1,4-Glucanen zur Durchführung  
erfindungsgemäßer Verfahren, können verschiedene Puffer verwendet werden.  
Grundsätzlich sind alle Puffer geeignet, die die Bindung der zu identifizierenden  
20 Proteine an das betreffende Substrat erlauben. Bevorzugt wird der weiter unten  
beschriebene Puffer (siehe Allgemeine Methoden 1) verwendet.

Unter dem Begriff „Protein, dass eine alpha-1,4-Glucan phosphorylierende  
enzymatische Aktivität aufweist und phosphorylierte alpha-1,4-Glucose als Substrat  
benötigt“, soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ein Protein  
25 verstanden werden, welches Phosphatreste kovalent in P-alpha-1,4-Glucose  
einführt, also P-alpha-1,4-Glucose als Substrat für die Übertragung von  
Phosphatresten verwendet, während nicht-phosphorylierte-alpha-1,4-Glucose von  
einem betreffenden Protein nicht phosphoryliert werden, d.h. nicht-phosphorylierte-  
alpha-1,4-Glucose dienen nicht als Substrat für eine Phosphorylierungsreaktion.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft das erfindungsgemäße Verfahren zur Identifizierung eines Proteins, dass eine alpha-1,4-Glucan phosphorylierende enzymatische Aktivität aufweist und phosphorylierte alpha-1,4-Glucane als Substart  
5 benötigt, ein Verfahren zur Identifizierung eines Proteins, das ATP als weiteres Substrat verwendet.

ATP wird in dieser Ausführungsform der vorliegenden Erfindung als weiteres Substrat (Co-Substrat) von dem Protein, das eine alpha-1,4-Glucan phosphorylierende enzymatische Aktivität aufweist und phosphorylierte alpha-1,4-  
10 Glucane als Substart benötigt, verwendet, d.h. das betreffende Protein überträgt einen Phosphatrest von ATP auf ein bereits phosphoryliertes P-alpha-1,4-Glucan.

Nachgewiesen werden kann die Aktivität eines Proteins, welches ATP als Co-Substrat zur Übertragung von Phosphatresten auf P-alpha-1,4-Glucane verwendet, z.B. durch Verwendung von ATP, welches einen markierten Phosphatrest enthält  
15 (markiertes ATP). Zu bevorzugen ist ATP, bei welchem der Phosphatrest in beta-Position spezifisch markiert ist, d.h. bei welchem nur der Phosphatrest in beta-Position eine Markierung trägt. Bevorzugt wird radioaktiv markiertes ATP, besonders bevorzugt ATP, bei welchem der Phosphatrest in beta-Position spezifisch radioaktiv markiert ist und insbesondere bevorzugt wird ATP, bei welchem der Phosphatrest in  
20 beta-Position spezifisch mit  $^{33}\text{P}$  markiert ist, verwendet. Wird ein P-alpha-Glucan phosphorylierendes Protein mit P-alpha-1,4-Glucanen in Gegenwart von markiertem ATP inkubiert, so kann anschließend kovalent an das P-alpha-1,4-Glucan gebundenes markiertes Phosphat nachgewiesen werden. Dabei können die P-alpha-Glucane sowohl in Form von Stärkephosphat enthaltender pflanzlicher Stärke  
25 (Kartoffelstärke, Stärke aus *Curcuma armada*, *C. zedoaria*, *C. longa*, Reis, Mungbohne, Tapioca etc.), als auch in Form von enzymatisch phosphorylierten P-alpha-1,4-Glucanen oder chemisch-phosphorylierten P-alpha-1,4-Glucanen vorliegen. Bevorzugt wird Stärke aus Blättern von *Arabidopsis thaliana*, besonders bevorzugt mittels eines R1 Proteins enzymatisch phosphorylierte Stärke aus  
30 *Arabidopsis thaliana* *sex1-3* Mutanten verwendet.

Nachgewiesen werden können markierte Phosphatreste, die durch ein Protein in ein P-alpha-1,4-Glucan eingebaut wurden z.B. durch Abtrennung des markierten P-alpha-1,4-Glucans (z.B. durch Ausfällen der alpha-1,4-Glucane mittels Ethanol, Filtration, chromatographische Methoden, Zentrifugation etc.) vom Rest des  
5 Reaktionsgemisches und anschließender Detektion der markierten Phosphatreste in der betreffenden P-alpha-1,4-Glucan Fraktion. Die in der P-alpha-1,4-Glucan Fraktion gebundenen markierten Phosphatreste können dabei z.B. durch Bestimmung der Menge der in der P-alpha-1,4-Glucan Fraktion vorliegenden Radioaktivität (z.B. mittels Scintillationszähler) nachgewiesen werden.

10

In einer weiteren Ausführungsform betrifft das erfindungsgemäße Verfahren zur Identifizierung eines Proteins, das alpha-1,4-Glucan phosphorylierende enzymatische Aktivität aufweist und phosphorylierte-alpha-1,4-Glucane als Substart benötigt, ein Verfahren, worin das Protein mit alpha-1,4-Glucan phosphorylierender,  
15 enzymatischer Aktivität P-Stärke als Substrat verwendet. Besonders bevorzugt handelt es sich um Stärke, isoliert aus einer *sex1-3* Mutante von *Arabidopsis thaliana*, die nachträglich enzymatisch phosphoryliert wurde. Zur Durchführung dieser bevorzugten Ausführungsform erfindungsgemäßer Verfahren wird dementsprechend in den Verfahrensschritten c) i eine phosphorylierte-Stärke und in  
20 Verfahrenschritt c) ii eine nicht-phosphorylierte-Stärke eingesetzt.

Dadurch ist es möglich, Proteine zu identifizieren, welche P-Stärke phosphorylieren. Solche Proteine sind besonders geeignet, um Stärke in pflanzlichen Organismen mittels genetischer Manipulation entsprechender Pflanzen zu modifizieren.

25 In einer weiteren Ausführungsform betrifft das erfindungsgemäße Verfahren zur Identifizierung eines Proteins, dass eine alpha-1,4-Glucan phosphorylierende enzymatische Aktivität aufweist und phosphorylierte alpha-1,4-Glucane als Substart benötigt, ein Verfahren zur Identifizierung eines Proteins, worin das Protein bei der Übertragung eines Phosphatrestes auf ein P-alpha-1,4-Glucan als phosphoryliertes

Zwischenprodukt auftritt. Bevorzugt entsteht das genannte Zwischenprodukt durch Autophosphorylierung des betreffenden Proteins.

Ein phosphoryliertes Protein, welches als Zwischenprodukt durch Protein vermittelte Phosphorylierung von P-alpha-1,4-Glucanen entsteht, kann wie bei Ritte et al. (2002, 5 PNAS 99, 7166-7171) für ein R1 Protein beschrieben, nachgewiesen werden.

Zum Nachweis des Vorliegens eines autophosphorylierten Zwischenproduktes wird ein Protein zunächst in Abwesenheit von Glucanen mit markiertem ATP, bevorzugt mit spezifisch in beta-Phosphat-Position markiertem ATP, besonders bevorzugt mit spezifisch mit  $^{33}\text{P}$  in beta-Phosphat-Position markiertem ATP für 15 bis 45 Minuten, 10 besonders bevorzugt für 20 bis 40 Minuten und insbesondere besonders bevorzugt für 25 bis 30 Minuten in einem Reaktionsansatz 1 inkubiert. Parallel dazu wird ein Reaktionsansatz 2, der jedoch an Stelle von markiertem ATP entsprechende Mengen nicht-markiertes ATP enthält, unter ansonsten gleichen Bedingungen inkubiert. Anschließend wird nicht markiertes ATP dem Reaktionsgemisch 1 im 15 Überschuß und eine Mischung aus nicht-markiertem ATP und markiertem ATP (gleiche Menge von markiertem ATP wie zuvor in Reaktionsgemisch 1 eingesetzt und gleiche Menge an nicht-markiertem ATP wie dem Reaktionsgemisch 1 im Überschuß zugesetzt) dem Reaktionsgemisch 2 hinzu gegeben und für weitere 1 Minute bis 5 Minuten, bevorzugt für 2 bis 5 Minuten und insbesondere bevorzugt für 20 3 Minuten inkubiert, bevor zu einem Teil A des Reaktionsgemisches 1 (Teil 1A) bzw. zu einem Teil A des Reaktionsgemisches 2 (Teil 2A) P-alpha-1,4-Glucane hinzu gegeben werden. Die Reaktion im verbleibenden Teil 1B und Teil 2B des Reaktionsgemisches wird durch Denaturieren des Proteins gestoppt. Das Stoppen des Teils B der Reaktionsgemische kann durch dem Fachmann bekannte Methoden, 25 welche zur Denaturierung von Proteinen führen, bevorzugt durch Zugabe von Natriumlaurylsulfat (SDS) erfolgen. Teil 1A und Teil 2A der Reaktionsgemische werden für mindestens weitere 10 Minuten inkubiert, bevor auch diese Reaktionen gestoppt werden. Die in Teil A bzw. Teil B der jeweiligen Reaktionsgemische vorliegenden alpha-1,4-Glucane werden vom jeweiligen Rest der Reaktionsgemische 30 abgetrennt. Findet die Abtrennung der jeweiligen alpha-1,4-Glucane z.B. durch

Zentrifugation statt, so befinden sich die alpha-1,4-Glucane des jeweiligen Teils A bzw. jeweiligen Teils B der Reaktionsgemische nach erfolgter Zentrifugation im sedimentierten Pellet und die sich in den jeweiligen Reaktionsgemischen befindlichen Proteine befinden sich im jeweiligen Zentrifugationsüberstand. Der  
5 Überstand des Teils 1A bzw. 2A und des Teils 1B bzw. 2B der Reaktionsgemische kann anschließend z.B. jeweils in einer denaturierenden Acrylamidgelelektrophorese, gefolgt von einer Autoradiographie des erhaltenen Acrylamidgels analysiert werden. Zur Quantifizierung der Menge an radioaktiv markierten Proteinen, die mittels Acrylamidgelelektrophorese aufgetrennt wurden, kann z.B. die dem Fachmann  
10 bekannte Methode des so genannten „Phosphoimaging“ verwendet werden. Zeigt die Autoradiographie oder die Analyse mittels „Phosphoimager“ von Proteinen im Zentrifugationsüberstand des Teil B des Reaktionsgemisches 1 ein gegenüber dem Zentrifugationsüberstand des Teil A des Reaktionsgemisches 1 ein signifikant erhöhtes Signal, so zeigt dieses, dass das eine Phosphorylierung von alpha-  
15 Glucanen vermittelnde Protein als autophosphoryliertes Zwischenprodukt auftritt. Die Teile A und B des Reaktionsgemisches 2 dienen als Kontrolle und sollten daher im Zentrifugationsüberstand kein signifikant erhöhtes Signal in der Autoradiographie oder in der Analyse mittels „Phosphoimager“ aufweisen.

Zusätzlich können die im jeweiligen sedimentierten Pellet verbliebenen alpha-1,4-  
20 Glucane des jeweiligen Teils A der Reaktionsgemische 1 und 2, gegebenenfalls nach anschließendem Waschen der jeweiligen alpha-1,4-Glucane, auf das Vorliegen von Stärkephosphat, welches eine dem eingesetzten markierten ATP entsprechende Markierung aufweist, hin untersucht werden. Enthalten die alpha-1,4-Glucane des Teils A des Reaktionsgemisches 1 markierte Phosphatreste und zeigt, die  
25 Autoradiographie des Zentrifugationsüberstandes des Teil B des Reaktionsgemisches 1 ein gegenüber dem Zentrifugationsüberstand des Teil A des Reaktionsgemisches 1 ein signifikant erhöhtes Signal in der Autoradiographie, so zeigt dieses, dass das eine Phosphorylierung von alpha-Glucanen vermittelnde Protein als autophosphoryliertes Zwischenprodukt vorliegt. Die Teile A und B des  
30 Reaktionsgemisches 2 dienen als Kontrolle und sollten daher im sedimentierten



Pellet, enthaltend alpha-1,4-Glucane, kein signifikant erhöhtes Signal für mit  $^{33}\text{P}$  markierte alpha-1,4-Glucane aufweisen.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft das erfindungsgemäße Verfahren zur  
5 Identifizierung eines Proteins, dass eine alpha-1,4-Glucan phosphorylierende  
enzymatische Aktivität aufweist und phosphorylierte alpha-1,4-Glucane als Substart  
benötigt, ein Verfahren zur Identifizierung eines Proteins, welches bevorzugt  
Phosphatmonoesterbindungen in C-2-Position oder in C-3-Position, besonders  
bevorzugt in C-3-Position eines Glucosemoleküls eines P-alpha-1,4-Glucans  
10 einführt.

Welche Positionen der Kohlestoffatome (C-2, C-3 oder C-6) der Glucosemonomere  
im P-alpha-1,4-Glucan von einem Protein oder Proteinextrakt bevorzugt  
phosphoryliert werden, kann z.B. durch Analyse der durch ein Protein oder  
Proteinextrakt phosphorylierten P-alpha-1,4-Glucane wie bei Ritte et al. (2002, PNAS  
15 99, 7166-7171) beschrieben, ermittelt werden. Hierzu werden durch ein Protein oder  
einen Proteinextrakt zusätzlich phosphorylierte P-alpha-1,4-Glucane unter  
Verwendung von Säure hydrolysiert und anschließend mittels Anionenaustausch-  
Chromatographie analysiert.

Bevorzugt werden die von einem Protein phosphorylierten P-alpha-1,4-Glucane  
20 mittels NMR analysiert, um festzustellen, welche Positionen der Kohlestoffatome (C-  
2, C-3 oder C-6) der Glucosemonomere im P-alpha-1,4-Glucan phosphoryliert  
werden.

Proteine der erfindungsgemäßen Verfahren zur Identifizierung eines Proteins, das  
25 alpha-1,4-Glucan phosphorylierende enzymatische Aktivität aufweist und  
phosphorylierte alpha-1,4-Glucane als Substart benötigt, welche nach  
Verfahrensschritt b) erhalten wurden, werden in Schritt c) erfindungsgemäßer  
Verfahren in getrennten Ansätzen enthaltend ATP und P-alpha-1,4-Glucan bzw. ATP  
und nicht-phosphoryliertes-alpha-1,4-Glucan inkubiert. Bevorzugt wird dabei zur

Durchführung der erfindungsgemäßen Verfahren ATP, welches einen markierten Phosphatrest, besonders bevorzugt einen in beta-Position spezifisch markierten Phosphatrest, insbesondere einen in beta-Position spezifisch, radioaktiv markierten Phosphatrest enthält, eingesetzt.

- 5 Die Inkubation von erfindungsgemäß in Lösung gebrachten Proteinen mit ATP und P-alpha-1,4-Glucanen nach Verfahrensschritt c) i bzw. nicht-phosphorylierten-alpha-1,4-Glucanen nach Schritt c) ii erfindungsgemäßer Verfahren zur Identifizierung eines Proteins, das alpha-1,4-Glucan phosphorylierende enzymatische Aktivität aufweist und phosphorylierte alpha-1,4-Glucane als Substart benötigt, findet  
10 bevorzugt bei einer Temperatur von 20°C bis 30°C, besonders bevorzugt von 23°C bis 27°C und insbesondere bevorzugt von 24°C bis 26°C statt und wird für eine Dauer von mindestens 15 Minuten, bevorzugt für mindestens 20 Minuten, besonders bevorzugt für mindestens 30 Minuten durchgeführt. Die Menge des eingesetzten ATPs beträgt dabei bevorzugt mindestens 0,05 µM, besonders bevorzugt  
15 mindestens 3 µM und insbesondere bevorzugt mindesten 5 µM. Die Konzentration des eingesetzten P-alpha-1,4-Glucans bzw. des eingesetzten nicht-phosphorylierten-alpha-1,4-Glucans beträgt dabei bevorzugt mindestens 1 mg/ml, besonders bevorzugt mindestens 10 mg/ml und insbesondere bevorzugt mindestens 25 mg/ml. Nach erfolgter Inkubation können die Reaktionen von Proteinextrakten mit P-alpha-1-  
20 4-Glucanen bzw. nicht-phosphorylierten-alpha-1,4-Glucanen gestoppt werden. Das Stoppen des jeweiligen Reaktionsgemisches kann durch dem Fachmann bekannte Methoden, welche zur Denaturierung von Proteinen führen, bevorzugt durch Zugabe von Natriumlaurylsulfat und Erhitzen für 5 Minuten auf 95°C erfolgen. Bei der Durchführung von Schritt c i) bzw. c ii) des erfindungsgemäßen Verfahrens zur  
25 Identifizierung eines Proteins, das alpha-1,4-Glucan phosphorylierende enzymatische Aktivität aufweist und P-alpha-1,4-Glucane als Substart benötigt, sind bei der Inkubation von Proteinen mit P-alpha-1,4-Glucanen bzw. nicht-phosphorylierten-alpha-1,4-Glucanen jeweils gleiche Inkubationsbedingungen für die jeweiligen Inkubationsansätze durchzuführen.

Das nach Durchführung erfindungsgemäßer Verfahren zur Identifizierung eines Proteins, das alpha-1,4-Glucan phosphorylierende enzymatische Aktivität aufweist und phosphorylierte-alpha-1,4-Glucane als Substart benötigt, erhaltene P-alpha-1,4-Glucan nach Verfahrensschritt c) i bzw. das erhaltene nicht-phosphorylierte-alpha-1,4-Glucan nach Verfahrensschritt c) ii wird auf die Einführung von zusätzlichen Phosphatresten hin untersucht. Zur Feststellung, ob durch die Verfahrensschritte c) i und/oder c) ii zusätzlich Phosphatreste in die betreffenden alpha-1,4-Glucane eingeführt wurden, kann jede Methode verwendet werden, welche zur spezifischen Detektion der verwendeten Markierung des in den Verfahrensschritten c) i und c) ii verwendeten markierten ATPs möglich ist. Wird z.B. radioaktiv markiertes ATP in den Verfahrensschritten c) i bzw. c) ii eingesetzt, so kann dieses mit dem Fachmann bekannten Methoden zur Aufspürung radioaktiver Elemente wie z.B. Autoradiographie, Messung der Radioaktivität mittels geeigneter Geräte (z.B. Scintillationszähler, „Phosphoimager“ etc.) erfolgen.

15

Proteine, eingesetzt in Verfahrensschritt b) erfindungsgemäßer Verfahren zur Identifizierung eines Proteins, das alpha-1,4-Glucan phosphorylierende enzymatische Aktivität aufweist und phosphorylierte alpha-1,4-Glucane als Substart benötigt, die in Schritt c) i signifikante Mengen an Phosphatresten in P-alpha-1,4-Glucane eingeführt haben, jedoch im Vergleich dazu in Schritt c) ii keine signifikanten Mengen an Phosphatresten in nicht-phosphorylierte-alpha-1,4-Glucane eingeführt haben, können mittels dem Fachmann bekannten Methoden identifiziert werden.

Unter dem Begriff „signifikante Mengen“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung eine Menge verstanden werden, die mindestens zweifach, bevorzugt mindestens vierfach, besonders bevorzugt mindestens sechsfach und insbesondere bevorzugt mindestens achtfach höher ist, als die in entsprechenden Kontrollexperimenten ermittelte Menge.

Als Kontrollexperimente können hierbei Inkubationsansätze verwendet werden, die statt nativen Proteinextrakten vollständig inaktivierte Proteinextrakte oder keine Proteinextrakte enthalten. Als „vollständig inaktiviert“ sind Proteinextrakte anzusehen, in welchen keine alpha-1,4-Glucan phosphorylierende enzymatische  
5 Aktivität mehr nachgewiesen werden kann.

Die Identifizierung von Proteinen bei Durchführung erfindungsgemäßer Verfahren zur Identifizierung eines Proteins, welches eine erhöhte Bindungsaktivität gegenüber phosphorylierten alpha-1,4-Glucanen im Vergleich zu nicht phosphorylierten alpha-  
10 1,4-Glucanen aufweist, kann mit Hilfe dem Fachmann bekannten Methoden, wie z.B. der Ermittlung der Aminosäuresequenz der betreffenden Proteine nach Methoden umfassend Edmann-Abbau, der Massenanalyse mittels MALDI-TOF-MS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Off Flight-Mass Spectroscopy), gefolgt von Vergleichen mit Datenbanken, enthaltend Massenprofile von Proteinen, der  
15 Aminosäuresequenzermittlung mittels Q-TOF-Analyse oder TOF/TOF-Analyse etc. erfolgen. Bevorzugt findet die Identifizierung der betreffenden Proteine mittels Q-TOF-MS-MS-Analyse statt, insbesondere bevorzugt werden die Proteine mit Hilfe der weiter unten beschriebenen Methode (siehe Allgemeine Methoden 10) identifiziert.

Werden Proteine mittels MALDI-TOF-MS, gefolgt von Vergleichen mit Datenbanken,  
20 enthaltend Massenprofile von Proteinen, ermittelt, so werden die betreffenden Proteine vorher zunächst enzymatisch verdaut bevor die einzelnen Massen der aus dem Verdau hervorgegangenen Proteinfragmente (Peptide) mittels MALDI-TOF-MS analysiert werden. Man erhält ein Massenprofil des betreffenden Proteins. Diese Massenprofile sind sehr spezifisch für ein Protein, da zum Verdau der Proteine  
25 sequenzspezifische Proteasen eingesetzt werden, die nur dann eine Peptidbindung spalten, wenn sie in einer spezifischen Aminosäuresequenzabfolge enthalten ist. Ist die spezifische Aminosäuresequenz, welche als Erkennungssequenz für eine bestimmte Protease dient, bekannt, so kann man von jeder beliebigen Aminosäuresequenz ein theoretisches Massenprofil erstellen, indem man die  
30 Massen der Peptide berechnet, die nach Verdau der Aminosäuresequenz mit einer

spezifischen Protease entstehen würden. Durch Vergleich von tatsächlich mittels MALDI-TOF-MS ermittelten Massenprofilen unbekannter Proteine mit den theoretisch ermittelten Massenprofilen in entsprechenden Datenbanken, können damit auch Aminosäuresequenzen ermittelt werden. Aminosäuresequenzen enthalten.

5

In einer weiteren Ausführungsform erfindungsgemäßer Verfahren zur Identifizierung eines Proteins, das alpha-1,4-Glucan phosphorylierende enzymatische Aktivität aufweist und phosphorylierte alpha-1,4-Glucane als Substrat benötigt, werden die durch Inkubation von Proteinextrakten mit P-alpha-1,4-Glucanen nach Schritt a) erhaltenen P-alpha-1,4-Glucan-Protein-Komplexe von den nicht an die betreffenden alpha-1,4-Glucane gebundenen Proteinen getrennt.

In einer weiteren Ausführungsform erfindungsgemäßer Verfahren zur Identifizierung eines Proteins, das alpha-1,4-Glucan phosphorylierende enzymatische Aktivität aufweist und phosphorylierte alpha-1,4-Glucane als Substrat benötigt, werden die nach Schritt b) erfindungsgemäßer Verfahren in Lösung gebrachten Proteine von den in Schritt a) eingesetzten P-alpha-1,4-Glucanen abgetrennt.

In einer weiteren Ausführungsform, erfindungsgemäßer Verfahren zur Identifizierung eines Proteins, das alpha-1,4-Glucan phosphorylierende enzymatische Aktivität aufweist und phosphorylierte alpha-1,4-Glucane als Substrat benötigt, werden die bei Durchführung erfindungsgemäßer Verfahren nach Verfahrensschritt b) erhaltenen in Lösung gebrachten P-alpha-1,4-Glucane-bindenden-Proteine, voneinander getrennt.

25 In einer weiteren Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verfahren zur Identifizierung eines Proteins, das alpha-1,4-Glucan phosphorylierende enzymatische Aktivität aufweist und phosphorylierte alpha-1,4-Glucane als Substrat



benötigt, werden die durch Inkubation von Proteinextrakten nach Schritt c) i mit P-alpha-1,4-Glucanen bzw. nach Schritt. c) ii mit nicht-phosphorylierten-alpha-1,4-Glucanen erhaltenen Glucane von den im Reaktionsgemisch vorliegenden Proteinen und/oder dem im Reaktionsgemisch vorliegenden markierten ATP getrennt.

- 5 Vorzugsweise wird dabei zur Abtrennung der alpha-1,4-Glucane eine Filtration verwendet, besonders bevorzugt eine Zentrifugation, insbesondere bevorzugt die weiter unten beschriebene Methode (siehe Allgemeine Methoden 8) verwendet. Nach erfolgter Zentrifugation unter Verwendung eines Percoll Kissens befinden sich löslichen Substanzen des Reaktionsgemisches im Überstand des  
10 Zentrifugationsmediums, während die alpha-1,4-Glucane im sedimentierten Pellet vorliegen.

Eine weitere Ausführungsform erfindungsgemäßer Verfahren zur Identifizierung eines Proteins, das alpha-1,4-Glucan phosphorylierende enzymatische Aktivität  
15 aufweist und phosphorylierte alpha-1,4-Glucane als Substrat benötigt betrifft ein Verfahren zur Identifizierung eines Proteins, das ein von der Aminosäuresequenz abgeleitetes Molekulargewicht von 120 kDa bis 145 kDa, bevorzugt von 120 kDa bis 140 kDa, besonders bevorzugt von 125 kDa bis 140 kDa, insbesondere bevorzugt von 130 kDa bis 135 kDa aufweist.

20

In einer weiteren Ausführungsform erfindungsgemäßer Verfahren zur Identifizierung eines Proteins, werden nach Identifizierung der betreffenden Proteine Aminosäuresequenzen ermittelt, die diese Proteine codieren.

Die Ermittlung von Aminosäuresequenzen kann erfindungsgemäß mit dem  
25 Fachmann bekannten Methoden erfolgen. Solche Methoden sind ausreichend in der Fachliteratur beschrieben (z.B. in Protein Sequencing and Identification Using Tandem Mass Spectrometry, 2000, John Wiley & Sons Inc, ISBN: 0-471-32249-0; Protein Sequencing Protocols, 2002, Smith (Edt), Edition: 2<sup>ND</sup>, Humana Press, ISBN: 0-89603-975-7) und sind grundsätzlich für die Durchführung erfindungsgemäßer

Verfahren geeignet. Auch wird von vielen Firmen (z.B. Eurogentec, Searing, Belgien) die Aufreinigung und/oder Sequenzierung von Proteinen als Auftragservice durchgeführt.

Falls notwendig, können Proteine, identifiziert mit einem erfindungsgemäßen  
5 Verfahren zur Identifizierung eines Proteins vor der Ermittlung ihrer Aminosäuresequenz einer weiteren Aufreinigung und/oder Konzentrierung unterzogen werden. Methoden zur Aufreinigung und/oder Konzentrierung von Proteinen sind in der Fachliteratur ausreichend beschrieben (z.B. in Methods in Enzymology: Guide to Protein Purification, Vol.182 1990, Deutscher, Murray P. (Edt),  
10 Academic Press, ISBN: 0-12-182083-1; Isolation and Purification of Proteins: Hattikaul, 2003, Rajni (Edt); Mattiasson, Bo (Edt), Marcel Dekker Inc, ISBN:0-8247-0726-5,, Protein Purification Techniques: A Practical Approach. Roe, 2001, Simon (Edt). The Practical Approach Series, 244. Edition: 2ND. Oxford Univ Press, ISBN: 0-19-963673-7) und sind grundsätzlich für die Durchführung erfindungsgemäßer  
15 Verfahren geeignet.

In einer weiteren Ausführungsform erfindungsgemäßer Verfahren zur Identifizierung eines Proteins, dienen erfindungsgemäße Verfahren zur Identifizierung eines Proteins, dessen es codierende Aminosäuresequenz eine Phosphohistidindomäne  
20 (Tien-Shin Yu et al., 2001, Plant Cell 13, 1907-1918) aufweist. Vorzugsweise weist die Phosphohistidindomäne, zu der unter SEQ ID NO 5 dargestellten Aminosäuresequenz der Phosphohistidindomäne des OK1 Proteins aus Arabidopsis thaliana und Oryza sativa eine Identität von mindestens 50%, insbesondere von mindestens 60%, bevorzugt von mindestens 70% und besonders bevorzugt von  
25 mindestens 80% und insbesondere bevorzugt von mindestens 90% auf.

In einer weiteren Ausführungsform erfindungsgemäßer Verfahren zur Identifizierung eines Proteins, dienen erfindungsgemäße Verfahren zur Identifizierung eines Proteins, dessen es codierende Aminosäuresequenz eine Phosphohistidindomäne

(Tien-Shin Yu et al., 2001, Plant Cell 13, 1907-1918) aufweist, wobei die Phosphohistidindomäne zwei Histidine enthält.

Mit Hilfe erfindungsgemäßer Verfahren können Proteine identifiziert werden, welche  
5 eine erhöhte Bindungsaktivität gegenüber P-alpha-1,4-Glucanen im Vergleich zu nicht-phosphorylierten-alpha-1,4-Glucanen aufweisen.

Daher sind auch Proteine Gegenstand der vorliegenden Erfindung, die mit erfindungsgemäßen Verfahren zur Identifizierung eines Proteins, welches eine  
10 erhöhte Bindungsaktivität gegenüber P-alpha-1,4-Glucanen, im Vergleich zu nicht-phosphorylierten-alpha-1,4-Glucanen aufweist, erhältlich sind.

Mit Hilfe erfindungsgemäßer Verfahren können Proteine identifiziert werden, die eine alpha-1,4-Glucan phosphorylierende enzymatische Aktivität aufweisen und P-  
15 alpha-1,4-Glucane als Substrat benötigen.

Weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Proteine, die mit erfindungsgemäßen Verfahren zur Identifizierung eines Proteins, dass eine alpha-1,4-Glucan phosphorylierende enzymatische Aktivität aufweist und phosphorylierte  
20 alpha-1,4-Glucane als Substrat benötigt, erhältlich sind.

Weiterhin ist Gegenstand der vorliegenden Erfindung ein Verfahren zur Identifizierung einer Nucleinsäure, codierend ein Protein, welches eine alpha-1,4-Glucan phosphorylierende enzymatische Aktivität aufweist, worin

25 a) ein Protein mit einem erfindungsgemäßen Verfahren zur Identifizierung eines Proteins identifiziert wird,

- b) Aminosäuresequenzen, codierend das nach Schritt a) identifizierte Protein ermittelt werden und
- c) Nucleinsäuren mit Hilfe der nach Schritt b) ermittelten Aminosäuren identifiziert werden, die ein nach Schritt a) identifiziertes Protein codieren.

5

Die Aminosäuresequenz der mit einem erfindungsgemäßen Verfahren identifizierten Proteine kann wie oben bereits ausgeführt, mit Hilfe dem Fachmann bekannten Methoden ermittelt werden.

- 10 Basierend auf den nach Schritt b) des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Identifizierung einer Nucleinsäure, codierend ein Protein, welches eine alpha-1,4-Glucan phosphorylierende enzymatische Aktivität aufweist, ermittelten Aminosäuresequenzen können Nucleinsäuren identifiziert werden, die ein Protein, welches eine alpha-1,4-Glucan phosphorylierende enzymatische Aktivität aufweist,
- 15 codieren.

- Die Identifizierung von Nucleinsäuren, codierend ein Protein, welches eine alpha-1,4-Glucan phosphorylierende enzymatische Aktivität aufweist kann z.B. mittels Durchmusterung von Datenbanken wie sie z.B. von EMBL
- 20 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/index.htm>) oder NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) zur Verfügung gestellt werden, erfolgen. Hierbei wird eine oder werden mehrere Aminosäuresequenzen, ermittelt bei der Durchführung erfindungsgemäßer Verfahren, als so genannte Abfrage (= query) vorgegeben. Diese Abfragesequenz wird dann mittels statistischen
- 25 Computerprogrammen mit Sequenzen, die in den ausgewählten Datenbanken enthalten sind, verglichen. Solche Datenbankabfragen (z.B. blast oder fasta searches) sind dem Fachmann bekannt und können bei verschiedenen Anbietern durchgeführt werden.

Wird eine solche Datenbankabfrage z.B. beim NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) durchgeführt, so sollen die Standardeinstellungen, die für die jeweilige Vergleichsanfrage vorgegeben sind, benutzt werden. Für Proteinsequenzvergleiche (blastp) sind dieses folgende  
5 Einstellungen: Limit entrez = nicht aktiviert; Filter = low complexity aktiviert; Expect value = 10; word size = 3; Matrix = BLOSUM62; Gap costs: Existence = 11, Extension = 1.

Bei einer solchen Datenbankrecherche können z.B. die in der vorliegenden Erfindung bei der Durchführung erfindungsgemäßer Verfahren ermittelten  
10 Aminosäuresequenzen als Abfragesequenz (query) verwendet werden, um Nucleinsäuremoleküle zu identifizieren, die ein Protein, welches eine alpha-1,4-Glucan phosphorylierende enzymatische Aktivität aufweist, codieren.

Mit Hilfe der beschriebenen Methoden ist es auch möglich, Nucleinsäuremoleküle und/oder Aminosäuresequenzen zu identifizieren, welche zu Nucleinsäuremolekülen  
15 und/oder Proteinen, erhältlich mit erfindungsgemäßen Verfahren, einen hohen Grad an Identität aufweisen und ein Protein codieren, welches eine alpha-1,4-Glucan phosphorylierende enzymatische Aktivität aufweist.

Dem Fachmann sind Methoden bekannt, mit welchen er ausgehend von  
20 Aminosäuresequenzen für diese codierende Nucleinsäuren identifizieren kann (siehe z.B. Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3rd edition (2001) Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY. ISBN: 0879695773, Ausubel et al., Short Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons; 5th edition (2002), ISBN: 0471250929). Von Aminosäuresequenzen, codierend ein Protein,  
25 welches eine alpha-1,4-Glucan phosphorylierende enzymatische Aktivität aufweist, können entsprechend dem genetischen Code Nucleinsäuren abgeleitet werden, welche die betreffenden Aminosäuresequenzen codieren. Dem Fachmann ist bekannt, dass die zur Identifizierung von Nucleinsäuren grundsätzlich auch entsprechend dem genetischen Code degenerierte Oligonucleotide verwendet  
30 werden können. Anschließend können Oligonucleotide synthetisiert werden, die von



den Aminosäuresequenzen, erhalten bei der Durchführung erfindungsgemäßer Verfahren, abgeleitete Sequenzen darstellen. Mit Hilfe dieser synthetischen Oligonucleotide können Nucleinsäuren identifiziert werden, die Proteine, von deren Aminosäuresequenz die entsprechenden Oligonucleotidsequenzen abgeleitet wurden, codieren. Diese kann z.B. mittels Durchmusterung von Genbanken, wobei die genannten synthetischen Oligonucleotide als markierte Sonden in Form von Hybridisierungsprobe (-sonde) eingesetzt werden geschehen. Eine weitere Möglichkeit zur Identifizierung von Nucleinsäuren, codierend ein Protein, welches eine alpha-1,4-Glucan phosphorylierende enzymatische Aktivität aufweist, ist die Verwendung der synthetischen Oligonucleotide, abgeleitet von Aminosäuresequenzen, erhalten bei der Durchführung erfindungsgemäßer Verfahren, mittels Durchmusterung von Genbanken mit Hilfe PCR basierter Verfahren, worin die genannten synthetischen Oligonucleotide als so genannte „Primer“ verwendet werden. Genbanken können z.B. in Form von Cosmiden, Phagmiden, Plasmiden, YACs oder BACs vorliegen. Die DNA-Bibliotheken können sowohl genomische, als auch cDNA enthalten. Für PCR basierte Durchmusterungsverfahren ist bei Verwendung der so genannten RT-(Reverse Transcription) PCR auch die Verwendung von mRNA möglich. Die für die Durchführung erfindungsgemäßer Verfahren zur Identifizierung einer Nucleinsäure in Genbanken oder als mRNA vorliegenden Nucleinsäuren können dabei aus jedem Organismus stammen, bevorzugt stammen sie aus eukaryontischen, besonders bevorzugt aus pflanzlichen Organismen, insbesondere bevorzugt aus Cerealien.

Es ist für die Durchführung erfindungsgemäßer Verfahren zur Identifizierung einer Nucleinsäure, codierend ein Protein, welches eine alpha-1,4-Glucan phosphorylierende enzymatische Aktivität aufweist, nicht notwendig, dass in Schritt b) der erfindungsgemäßen Verfahren die gesamte das betreffende Protein codierende Aminosäuresequenz ermittelt wird, sondern es kann ausreichend sein, wenn nur Teile der betreffenden Aminosäuresequenzen, die ein betreffendes Protein codieren, ermittelt werden.

Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren zur Identifizierung einer Nucleinsäure, codierend ein Protein, welches eine alpha-1,4-Glucan phosphorylierende enzymatische Aktivität aufweist, worin

- 5 a) ein Protein mit einem erfindungsgemäßen Verfahren zur Identifizierung eines Proteins identifiziert wird,
- b) Aminosäuresequenzen, codierend das nach Schritt a) identifizierte Protein ermittelt werden,
- c) Ausgehend von den in Schritt b) ermittelten Aminosäuresequenzen  
10 Oligonucleotide synthetisiert werden und
- d) Nucleinsäuren mit Hilfe der nach Schritt c) synthetisierten Oligonucleotide identifiziert werden, die ein nach Schritt a) identifiziertes Protein codieren.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren zur  
15 Identifizierung einer Nucleinsäure, codierend ein Protein, welches eine alpha-1,4-Glucan phosphorylierende enzymatische Aktivität aufweist, worin

- a) ein Protein mit einem erfindungsgemäßen Verfahren zur Identifizierung eines Proteins identifiziert wird,
- b) Antikörper, die spezifisch mit dem nach Schritt a) identifizierten Protein  
20 reagieren, hergestellt werden und
- c) Nucleinsäuren mit Hilfe der nach Schritt b) ermittelten Antikörper identifiziert werden.

Methoden zur Herstellung von Antikörpern, die spezifisch mit einem bestimmten  
25 Protein reagieren, d.h. die spezifisch an besagtes Protein binden, sind dem Fachmann bekannt (siehe z.B. Lottspeich und Zorbas (Eds.), 1998, Bioanalytik, Spektrum akad, Verlag, Heidelberg, Berlin, ISBN 3-8274-0041-4). Die Herstellung

solcher Antikörper wird von einigen Firmen (z.B. Eurogentec, Belgien) als Auftragservice angeboten.

Methoden zur Identifizierung von Nucleinsäuren mit Hilfe von Antikörpern, in der  
5 Fachliteratur oft als „Immunoscreening“ bezeichnete Verfahren sind dem Fachmann  
ebenfalls bekannt und in der Literatur ausführlich beschrieben (siehe z.B. Lottspeich  
und Zorbas (Eds.), 1998, Bioanalytik, Spektrum akad. Verlag., Heidelberg, Berlin,  
ISBN 3-8274-0041-4). Zur Durchführung solcher Verfahren können z.B. so genannte  
10 Expressions-Genbanken verwendet werden, bei welchen die enthaltenen Klone auf  
die Expression eines bestimmten Proteins mit Hilfe eines gegen dieses Protein  
gerichteten spezifischen Antikörpers hin durchmustert werden. Materialien zur  
Herstellung solcher Expressions-Genbanken, enthaltend auch Anleitungen  
betreffend Verfahren zur Herstellung, als auch Verfahren zur Durchmusterung  
solcher Expressions-Genbanken sind käuflich erwerbbar (z.B. Stratagene).

15

Mit Hilfe erfindungsgemäßer Verfahren können Nucleinsäuren identifiziert werden,  
welche Proteine codieren, die eine erhöhte Bindungsaktivität gegenüber P-alpha-1,4-  
Glucanen im Vergleich zu nicht-phosphorylierten-alpha-1,4-Glucanen aufweisen  
und/oder die eine alpha-1,4-Glucan phosphorylierende enzymatische Aktivität  
20 aufweisen und phosphorylierte alpha-1,4-Glucane als Substrat benötigen.

Daher sind auch Nucleinsäuren Gegenstand der vorliegenden Erfindung, die mit  
erfindungsgemäßen Verfahren zur Identifizierung einer Nucleinsäure, codierend ein  
Protein, welches eine alpha-1,4-Glucan phosphorylierende enzymatische Aktivität  
25 aufweist und phosphorylierte alpha-1,4-Glucane als Substrat benötigt erhältlich sind.

Es wurde überraschenderweise gefunden, dass Genetisch modifizierte  
Pflanzenzellen oder Pflanzen, die eine erhöhte Aktivität eines erfindungsgemäßen

Proteins aufweisen, eine modifizierte Stärke synthetisieren, die in ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften, insbesondere dem Gehalt an Stärkephosphat bzw. der Phosphatverteilung im Vergleich zu in Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen synthetisierter Stärke verändert ist, so dass diese für spezielle Verwendungszwecke  
5 besser geeignet ist.

Daher betrifft ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung genetisch modifizierte Pflanzenzellen oder genetisch modifizierte Pflanzen, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine erhöhte enzymatische Aktivität eines  
10 erfindungsgemäßen Proteins im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen aufweisen.

Die genetische Modifikation kann dabei jede genetische Modifikation sein, die zu einer Erhöhung der Aktivität mindestens eines erfindungsgemäßen Proteins führt im  
15 Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen oder Wildtyp-Pflanzen.

Der Begriff „Wildtyp-Pflanzenzelle“ bedeutet im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung, dass es sich um Pflanzenzellen handelt, die als Ausgangsmaterial für die  
20 Herstellung der erfindungsgemäßen Pflanzenzellen dienen, d.h. deren genetische Information, abgesehen von der eingeführten genetischen Modifikation, der einer erfindungsgemäßen Pflanzenzelle entspricht.

Der Begriff „Wildtyp-Pflanze“ bedeutet im Zusammenhang mit der vorliegenden  
25 Erfindung, dass es sich um Pflanzen handelt, die als Ausgangsmaterial für die Herstellung der erfindungsgemäßen Pflanzen dienen, d.h. deren genetische Information, abgesehen von der eingeführten genetischen Modifikation, der einer erfindungsgemäßen Pflanze entspricht.

Der Begriff „entsprechend“ bedeutet im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung, dass beim Vergleich von mehreren Gegenständen die betreffenden Gegenstände, die miteinander verglichen werden, unter gleichen Bedingungen  
5 gehalten wurden. Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung bedeutet der Begriff „entsprechend“ im Zusammenhang mit Wildtyp-Pflanzenzelle oder Wildtyp-Pflanze, dass die Pflanzenzellen oder Pflanzen, die miteinander verglichen werden, unter gleichen Kulturbedingungen aufgezogen wurden und dass sie ein gleiches (Kultur-) Alter aufweisen.

10

Der Begriff "erhöhte Aktivität" bedeutet dabei im Rahmen der vorliegenden Erfindung eine Erhöhung der Expression endogener Gene, die erfindungsgemäße Proteine codieren und/oder eine Erhöhung der Menge an erfindungsgemäßen Proteinen in den Zellen und/oder eine Erhöhung der enzymatischen Aktivität erfindungsgemäßer  
15 Proteinen in den Zellen.

Die Erhöhung der Expression kann beispielsweise bestimmt werden durch Messung der Menge an erfindungsgemäße Proteine codierenden Transkripten, z.B. durch Northern-Blot-Analyse oder RT-PCR. Vorzugsweise werden hierbei zur Bestimmung  
20 einer erhöhten Expression erfindungsgemäßer Proteine Nucleinsäuremoleküle verwendet, die mit erfindungsgemäßen Verfahren zur Identifizierung einer Nucleinsäure identifiziert wurden. Eine Erhöhung bedeutet dabei vorzugsweise eine Erhöhung der Menge an Transkripten im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Zellen um mindestens 50%, insbesondere um mindestens  
25 70%, bevorzugt um mindestens 85% und besonders bevorzugt um mindestens 100%. Eine Erhöhung der Menge an Transkripten, codierend ein erfindungsgemäßes Protein, bedeutet auch, dass Pflanzen, die keine nachweisbaren Transkripte, codierend ein erfindungsgemäßes Protein, aufweisen, nach erfindungsgemäßer



genetischer Modifikation eine nachweisbare Menge an Transkripten, codierend ein erfindungsgemäßes Protein, aufweisen.

Die Erhöhung der Menge an Protein eines erfindungsgemäßen Proteins, die eine erhöhte Aktivität dieser Proteine in den betreffenden Pflanzenzellen zur Folge hat, kann beispielsweise bestimmt werden durch immunologische Methoden wie Western-Blot-Analyse, ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) oder RIA (Radio Immune Assay). Die Herstellung eines Antikörpers, der zur Messung der Erhöhung der Menge an Protein mittels immunologischer Methoden verwendet werden kann ist beispielhaft weiter unten beschrieben (siehe Beispiel 11). Eine Erhöhung bedeutet dabei vorzugsweise eine Erhöhung der Menge eines erfindungsgemäßen Proteins im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Zellen um mindestens 50%, insbesondere um mindestens 70%, bevorzugt um mindestens 85% und besonders bevorzugt um mindestens 100%. Eine Erhöhung der Menge eines erfindungsgemäßen Proteins bedeutet auch, dass Pflanzen, die keine nachweisbare Menge eines erfindungsgemäßen Proteins aufweisen, nach erfindungsgemäßer genetischer Modifikation eine nachweisbare Menge eines erfindungsgemäßen Proteins aufweisen.

In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung handelt es sich bei den erfindungsgemäßen Pflanzenzellen oder erfindungsgemäßen Pflanzen um Pflanzenzellen von Stärke speichernden Pflanzen bzw. um Stärke speichernde Pflanzen. Stärke speichernde Pflanzen sind z.B. Mais, Reis, Weizen, Roggen, Hafer, Gerste, Maniok, Kartoffel, Süßkartoffel, Sago, Mungbohne, Banane, Erbse, *Arabidopsis*, Curcuma oder Sorghum Pflanzen. Besonders bevorzugt sind Reis-, insbesondere bevorzugt Weizen Pflanzen.

Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft eine erfindungsgemäße genetisch modifizierte Pflanzenzelle oder eine erfindungsgemäße

genetisch modifizierte Pflanze, wobei die genetische Modifikation in der Einführung mindestens eines fremden Nucleinsäuremoleküls in das Genom der Pflanze besteht.

In diesem Zusammenhang bedeutet der Begriff „genetische Modifikation“ das  
5 Einführen von homologen und/oder heterologen fremden Nucleinsäuremolekülen in das Genom einer Pflanzenzelle oder in das Genom einer Pflanze, wobei besagtes Einführen dieser Moleküle zur Erhöhung der Aktivität eines erfindungsgemäßen Proteins führt.

Durch Einführung eines fremden Nucleinsäuremoleküls sind die erfindungsgemäßen  
10 Pflanzenzellen oder erfindungsgemäßen Pflanzen in ihrer genetischen Information verändert. Das Vorhandensein oder die Expression des fremden Nucleinsäuremoleküls führt zu einer phänotypischen Veränderung. „Phänotypische“ Veränderung bedeutet dabei vorzugsweise eine messbare Veränderung einer oder mehrerer Funktionen der Zellen. Beispielsweise zeigen die genetisch modifizierten  
15 erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und die genetisch modifizierten erfindungsgemäßen Pflanzen aufgrund des Vorhandenseins oder bei Expression des eingeführten Nucleinsäuremoleküls eine Erhöhung der Aktivität eines erfindungsgemäßen Proteins.

20 Unter dem Begriff "fremdes Nukleinsäuremolekül" versteht man im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ein solches Molekül, das entweder natürlicherweise in entsprechenden Wildtyp-Pflanzenzellen nicht vorkommt, oder das in der konkreten räumlichen Anordnung nicht natürlicherweise in Wildtyp-Pflanzenzellen vorkommt oder das an einem Ort im Genom der Wildtyp-Pflanzenzelle lokalisiert ist, an dem es  
25 natürlicherweise nicht vorkommt. Bevorzugt ist das fremde Nukleinsäuremolekül ein rekombinantes Molekül, das aus verschiedenen Elementen besteht, deren Kombination oder spezifische räumliche Anordnung natürlicherweise in pflanzlichen Zellen nicht auftritt.

Prinzipiell kann das fremde Nucleinsäuremolekül jedes beliebige Nucleinsäuremolekül sein, das in der Pflanzenzelle oder Pflanze eine Erhöhung der Aktivität eines erfindungsgemäßen Proteins bewirkt.

- 5 Unter dem Begriff „Genom“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung die Gesamtheit des in einer pflanzlichen Zelle vorliegenden Erbmaterials verstanden werden. Dem Fachmann ist bekannt, dass neben dem Zellkern auch andere Kompartimente (z.B. Plastiden, Mitochondrien) Erbmaterial enthalten.
- 10 Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft eine erfindungsgemäße genetisch modifizierte Pflanzenzelle oder eine erfindungsgemäße genetisch modifizierte Pflanze, wobei die genetische Modifikation in der Einführung mindestens eines fremden Nucleinsäuremoleküls in das Genom der Pflanze besteht und das fremde Nucleinsäuremolekül ein erfindungsgemäßes Protein codiert.

15

- Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft eine erfindungsgemäße genetisch modifizierte Pflanzenzelle oder eine erfindungsgemäße genetisch modifizierte Pflanze, wobei die genetische Modifikation in der Einführung mindestens eines fremden Nucleinsäuremoleküls in das Genom der Pflanze besteht
- 20 und wobei das fremde Nucleinsäuremolekül ein erfindungsgemäßes Nucleinsäuremolekül, bevorzugt ein erfindungsgemäßes Nucleinsäuremolekül, isoliert aus *Arabidopsis thaliana*, besonders bevorzugt isoliert aus Reis umfasst.

- Für die Einführung von DNA in eine pflanzliche Wirtszelle stehen eine Vielzahl von
- 25 Techniken zur Verfügung. Diese Techniken umfassen die Transformation pflanzlicher Zellen mit T-DNA unter Verwendung von *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes* als Transformationsmittel, die Fusion von Protoplasten,

die Injektion, die Elektroporation von DNA, die Einbringung der DNA mittels des biolistischen Ansatzes sowie weitere Möglichkeiten.

Die Verwendung der Agrobakterien-vermittelten Transformation von Pflanzenzellen ist intensiv untersucht und ausreichend in EP 120516; Hoekema, IN: The Binary  
5 Plant Vector System Offsetdrukkerij Kanters B.V., Alblasterdam (1985), Chapter V; Fraley et al., Crit. Rev. Plant Sci. 4, 1-46 und bei An et al. EMBO J. 4, (1985), 277-287 beschrieben worden. Für die Transformation von Kartoffel, siehe z.B. Rocha-Sosa et al., EMBO J. 8, (1989), 29-33.).

10 Auch die Transformation monokotyler Pflanzen mittels auf Agrobakterium Transformation basierender Vektoren wurde beschrieben (Chan et al., Plant Mol. Biol. 22, (1993), 491-506; Hiei et al., Plant J. 6, (1994) 271-282; Deng et al, Science in China 33, (1990), 28-34; Wilmink et al., Plant Cell Reports 11, (1992), 76-80; May et al., Bio/Technology 13, (1995), 486-492; Conner und Domisse, Int. J. Plant Sci.  
15 153 (1992), 550-555; Ritchie et al, Transgenic Res. 2, (1993), 252-265). Alternatives System zur Transformation von monokotylen Pflanzen ist die Transformation mittels des biolistischen Ansatzes (Wan und Lemaux, Plant Physiol. 104, (1994), 37-48; Vasil et al., Bio/Technology 11 (1993), 1553-1558; Ritala et al., Plant Mol. Biol. 24, (1994), 317-325; Spencer et al., Theor. Appl. Genet. 79, (1990), 625-631), die  
20 Protoplastentransformation, die Elektroporation von partiell permeabilisierten Zellen, die Einbringung von DNA mittels Glasfasern. Insbesondere die Transformation von Mais wird in der Literatur mehrfach beschrieben (vgl. z. B. WO95/06128, EP0513849, EP0465875, EP0292435; Fromm et al., Biotechnology 8, (1990), 833-844; Gordon-Kamm et al., Plant Cell 2, (1990), 603-618; Koziel et al., Biotechnology  
25 11 (1993), 194-200; Moroc et al., Theor. Appl. Genet. 80, (1990), 721-726).

Auch die erfolgreiche Transformation anderer Getreidearten wurde bereits beschrieben, z.B. für Gerste (Wan und Lemaux, s.o.; Ritala et al., s.o.; Krens et al., Nature 296, (1982), 72-74) und für Weizen (Nehra et al., Plant J. 5, (1994), 285-297). Alle vorstehenden Methoden sind im Rahmen der vorliegenden Erfindung geeignet.

Die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und die erfindungsgemäßen Pflanzen lassen sich von Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen unter anderem dadurch unterscheiden, dass sie ein fremdes Nucleinsäuremolekül enthalten, das  
5 natürlicherweise in Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen nicht vorkommt oder dadurch, dass ein solches Molekül an einem Ort im Genom der erfindungsgemäßen Pflanzenzelle oder im Genom der erfindungsgemäßen Pflanze integriert vorliegt, an dem es bei Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen nicht vorkommt, d.h. in einer anderen genomischen Umgebung. Ferner lassen sich  
10 derartige erfindungsgemäße Pflanzenzellen und erfindungsgemäße Pflanzen von Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen dadurch unterscheiden, dass sie mindestens eine Kopie des fremden Nucleinsäuremoleküls stabil integriert in ihr Genom enthalten, gegebenenfalls zusätzlich zu natürlicherweise in den Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen vorkommenden Kopien eines solchen  
15 Moleküls. Handelt es sich bei dem (den) in die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen oder erfindungsgemäßen Pflanzen eingeführten fremden Nucleinsäuremolekül(en) um zusätzliche Kopien zu bereits natürlicherweise in den Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen vorkommenden Molekülen, so lassen sich die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und die erfindungsgemäßen Pflanzen von  
20 Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen insbesondere dadurch unterscheiden, dass diese zusätzliche(n) Kopie(n) an Orten im Genom lokalisiert ist (sind), an denen sie bei Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen nicht vorkommt (vorkommen). Dies lässt sich beispielsweise mit Hilfe einer Southern Blot-Analyse nachprüfen.

Weiterhin lassen sich die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und  
25 erfindungsgemäßen Pflanzen von Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen vorzugsweise durch mindestens eines der folgenden Merkmale unterscheiden: Ist das eingeführte fremde Nucleinsäuremolekül heterolog in Bezug auf die Pflanzenzelle oder Pflanze, so weisen die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen oder erfindungsgemäßen Pflanzen Transkripte der eingeführten Nucleinsäuremoleküle  
30 auf. Diese lassen sich z. B. durch Northern-Blot-Analyse oder durch RT-PCR



(Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) nachweisen. Vorzugsweise enthalten die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und die erfindungsgemäßen Pflanzen ein Protein, das durch ein eingeführtes Nucleinsäuremolekül codiert wird. Dies kann z. B. durch immunologische Methoden, insbesondere durch eine Western-  
5 Blot-Analyse nachgewiesen werden.

Ist das eingeführte fremde Nucleinsäuremolekül homolog in Bezug auf die Pflanzenzelle oder Pflanze, können die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und die erfindungsgemäßen Pflanzen von Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen beispielsweise aufgrund der zusätzlichen Expression der eingeführten fremden  
10 Nucleinsäuremoleküle unterschieden werden. Die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und die erfindungsgemäßen Pflanzen enthalten vorzugsweise Transkripte der fremden Nucleinsäuremoleküle. Dies kann z. B. durch Northern-Blot-Analyse oder mit Hilfe der so genannten quantitativen PCR nachgewiesen werden.

15 In einer speziellen Ausführungsform handelt es sich bei den erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und bei den erfindungsgemäßen Pflanzen um transgene Pflanzenzellen bzw. transgene Pflanzen.

In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung synthetisieren  
20 erfindungsgemäße Pflanzenzellen und erfindungsgemäße Pflanzen, eine modifizierte Stärke im Vergleich zu Stärke, isoliert aus nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen.

Der Begriff „modifizierte Stärke“ bedeutet in Zusammenhang mit der vorliegenden  
25 Erfindung, dass die Stärke veränderte physico-chemische Eigenschaften gegenüber nicht modifizierter Stärke, erhältlich aus entsprechenden Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen aufweist.

In einer weiteren Ausführungsform synthetisieren die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen oder die erfindungsgemäßen Pflanzen eine modifizierte Stärke, die einen erhöhten Gehalt an Stärkephosphat und/oder eine veränderte Phosphatverteilung im Vergleich zu Stärke, isoliert aus entsprechenden Wildtyp-  
5 Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen aufweist.

In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens synthetisieren die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen oder die erfindungsgemäßen Pflanzen eine modifizierte Stärke, die ein verändertes C-3/C-6-Verhältnis des  
10 Stärkephosphates aufweist im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyppflanzenzellen bzw. nicht genetisch modifizierten Pflanzen. Insbesondere bevorzugt sind dabei Stärken, welche einen erhöhten Anteil von in C-3-Position gebundenem Stärkephosphat gegenüber von in C-6-Position gebundenem Stärkephosphat aufweisen im Vergleich zu entsprechenden Stärken, isoliert aus  
15 nicht genetisch modifizierten Wildtyppflanzenzellen bzw. nicht genetisch modifizierten Pflanzen.

Unter dem Begriff „Phosphatverteilung“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung der Anteil des in C-2-Position, C-3-Position oder C-6-Position eines  
20 Glucosemoleküles gebundenen Stärkephosphates bezogen auf den Gesamtgehalt an Stärkephosphat von alpha-1,4-Glucanen verstanden werden.

Unter dem Begriff „C-2/C-3/C-6-Verhältnis“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung der Anteil an Stärkephosphat verstanden werden, zu welchem das jeweils in C-2-Position, C-3-Position bzw. C-6-Position gebundene  
25 Stärkephosphat eines alpha-1,4-Glucans zu dem Gesamtgehalt des Stärkephosphates des betreffenden alpha-1,4-Glucans (C-2-Position + C-3-Position + C-6-Position) beiträgt.

Unter dem Begriff „C-3/C-6-Verhältnis“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung der Anteil an Stärkephosphat verstanden werden, zu welchem das jeweils

in C-3-Position bzw. C-6-Position gebundene Stärkephosphat eines alpha-1,4-Glucans zu der Summe aus dem in C-3-Position und in C-6-Position gebundenem Stärkephosphat (C-3-Position + C-6-Position) des betreffenden alpha-1,4-Glucans beiträgt.

5

Weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind erfindungsgemäße Pflanzenzellen oder erfindungsgemäße Pflanzen, die eine modifizierte Stärke synthetisieren, wobei die modifizierte Stärke dadurch gekennzeichnet ist, dass sie einen erhöhten Gehalt an kovalent an die Stärke gebundenem Phosphat in C-3-  
10 Position der Glucosemoleküle aufweist im Vergleich zu Stärke aus entsprechenden Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Pflanzen, enthaltend erfindungsgemäße Pflanzenzellen.

15

### **Beschreibung der Sequenzen**

SEQ ID NO 1: Nucleinsäuresequenz enthaltend die codierende Region des A.t.-OK1 Proteins aus *Arabidopsis thaliana*. Diese Sequenz ist den Vektoren OK1-pGEM-  
20 T und OK1-pDEST™17 und inseriert.

SEQ ID NO 2: Aminosäuresequenz codierend das A.t.-OK1 Protein aus *Arabidopsis thaliana*. Diese Sequenz ist von der unter SEQ ID NO 1 dargestellten Nucleinsäuresequenz ableitbar.

SEQ ID NO 3: Nucleinsäuresequenz enthaltend die codierende Region des  
25 O.s.-OK1 Proteins aus *Oryza sativa*. Diese Sequenz ist dem Vektor pMI50 inseriert.

SEQ ID NO 4: Aminosäuresequenz codierend das O.s.-OK1 Protein aus *Oryza sativa*. Diese Sequenz ist von der unter SEQ ID NO 3 dargestellten Nucleinsäuresequenz ableitbar.

SEQ ID NO 5: Peptidsequenz codierend die Phosphohistidindomäne der OK1  
5 Proteine aus *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* und *Sorghum bicolor*.

SEQ ID NO 6: Peptidsequenz enthaltend in der Aminosäuresequenz codierend ein H.v.-OK1 Protein aus Gerste.

SEQ ID NO 7: Peptidsequenz enthaltend in der Aminosäuresequenz codierend ein H.v.-OK1 Protein aus Gerste.

10 SEQ ID NO 8: Peptidsequenz enthaltend in der Aminosäuresequenz codierend ein H.v.-OK1 Protein aus Gerste.

SEQ ID NO 9: Partielle Nucleinsäuresequenz codierend ein H.v.-OK1 Protein aus Gerste. Diese Nucleinsäuresequenz wurde mittels der unter SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 7 und SEQ ID NO 8 dargestellten Peptidsequenzen mittels „Blast Search“ in  
15 der TIGR Datenbank identifiziert.

SEQ ID NO 10: Partielle Aminosäuresequenz codierend ein H.v.-OK1 Protein aus Gerste. Die dargestellte Aminosäuresequenz ist von der unter SEQ ID NO 9 dargestellten Nucleinsäuresequenz ableitbar.

SEQ ID NO 11: Peptidsequenz enthaltend in der Aminosäuresequenz codierend  
20 ein S.t.-OK1 Protein aus Kartoffel.

SEQ ID NO 12: Peptidsequenz enthaltend in der Aminosäuresequenz codierend ein S.t.-OK1 Protein aus Kartoffel.

SEQ ID NO 13: Peptidsequenz enthaltend in der Aminosäuresequenz codierend ein S.t.-OK1 Protein aus Kartoffel.

25 SEQ ID NO 14: Peptidsequenz enthaltend in der Aminosäuresequenz codierend ein S.t.-OK1 Protein aus Kartoffel.

SEQ ID NO 15: Partielle Nucleinsäuresequenz codierend ein S.t.-OK1 Protein aus Kartoffel. Diese Nucleinsäuresequenz wurde mittels der unter SEQ ID NO 11,

SEQ ID NO 12, SEQ ID NO 13 und SEQ ID NO 14 dargestellten Peptidsequenzen mittels „Blast Search“ in der TIGR Datenbank identifiziert.

SEQ ID NO 16: Partielle Aminosäuresequenz codierend ein S.t.-OK1 Protein aus Kartoffel. Die dargestellte Aminosäuresequenz ist von der unter SEQ ID NO 15  
5 dargestellten Nucleinsäuresequenz ableitbar.

SEQ ID NO 17: Peptidsequenz enthaltend in der Aminosäuresequenz codierend ein S.b.-OK1 Protein aus Hirse.

SEQ ID NO 18: Peptidsequenz enthaltend in der Aminosäuresequenz codierend ein S.b.-OK1 Protein aus Hirse.

10 SEQ ID NO 19: Peptidsequenz enthaltend in der Aminosäuresequenz codierend ein S.b.-OK1 Protein aus Hirse.

SEQ ID NO 20: Peptidsequenz enthaltend in der Aminosäuresequenz codierend ein S.b.-OK1 Protein aus Hirse.

SEQ ID NO 21: Partielle Nucleinsäuresequenz codierend ein S.b.-OK1 Protein  
15 aus Hirse. Diese Nucleinsäuresequenz wurde mittels der unter SEQ ID NO 17, SEQ ID NO 18, SEQ ID NO 19 und SEQ ID NO 20 dargestellten Peptidsequenzen mittels „Blast Search“ in der TIGR Datenbank identifiziert.

SEQ ID NO 22: Partielle Aminosäuresequenz codierend ein S.b.-OK1 Protein aus Hirse. Die dargestellte Aminosäuresequenz ist von der unter SEQ ID NO 21  
20 dargestellten Nucleinsäuresequenz ableitbar.

SEQ ID NO 23: Peptidsequenz enthaltend in der Aminosäuresequenz codierend ein T.s.-OK1 Protein aus Weizen.

SEQ ID NO 24: Peptidsequenz enthaltend in der Aminosäuresequenz codierend ein T.s.-OK1 Protein aus Weizen.

25 SEQ ID NO 25: Partielle Nucleinsäuresequenz codierend ein T.s.-OK1 Protein aus Weizen. Diese Nucleinsäuresequenz wurde mittels der unter SEQ ID NO 23 und SEQ ID NO 24 dargestellten Peptidsequenzen mittels „Blast Search“ in der TIGR Datenbank identifiziert.



SEQ ID NO 26: Partielle Aminosäuresequenz codierend ein T.s.-OK1 Protein aus Weizen. Die dargestellte Aminosäuresequenz ist von der unter SEQ ID NO 25 dargestellten Nucleinsäuresequenz ableitbar.

5

### Beschreibung der Abbildungen

Fig. 1: Denaturierendes Acrylamidgel zur Identifizierung von Proteinen aus *Arabidopsis thaliana*, die bevorzugt an nicht-phosphorylierte-Stärke im Vergleich zu phosphorylierter-Stärke binden. In Spur „M“ ist ein Standard Protein Molekulargewichtsmarker aufgetragen. In Spur „-“ sind Proteine, erhalten nach Inkubation des Kontrollansatzes C aus Beispiel 1 d) aufgetragen. In Spur „K“ sind Proteinextrakte von *Arabidopsis thaliana*, erhalten nach Inkubation mit nicht-phosphorylierter-Stärke, isoliert aus Blättern einer *Arabidopsis thaliana* *sex1-3* Mutante (Ansatz B, Beispiel 1 d)), aufgetragen. In Spur „P“ sind Proteinextrakte von *Arabidopsis thaliana*, erhalten nach Inkubation mit Stärke, isoliert aus Blättern einer *Arabidopsis thaliana* *sex1-3* Mutante, die nachträglich *in vitro* mit einem R1 Protein phosphoryliert wurde (Ansatz A, Beispiel 1 d)) aufgetragen. Nach erfolgter Elektrophorese wurde das Acrylamidgel mit Comassie Blau gefärbt.

Fig. 2: Nachweis der Autophosphorylierung des OK1 Proteins. Fig. 2 A) stellt ein nach erfolgter Elektrophorese mit Comassie Blau gefärbtes denaturierendes (SDS) Acrylamidgel dar. Fig. 2 B) zeigt die Autoradiographie eines denaturierenden (SDS) Acrylamidgels. Auf beide Gele wurden jeweils die gleichen Proben zu gleichen Mengen aufgetragen. M: Standard Protein Molekulargewichtsmarker; R1: Probe aus Reaktionsgefäß 1 nach Beispiel 7 (nach Inkubation eines OK1 Proteins mit ATP); R2: Probe aus Reaktionsgefäß 2 nach Beispiel 7 (nach Inkubation eines OK1 Proteins mit ATP wurde das Protein auf 95°C erhitzt); R3: Probe aus Reaktionsgefäß 3 nach Beispiel 7 (nach Inkubation eines OK1 Proteins mit ATP wurde das Protein in 0,5 M

HCl inkubiert); R4: Probe aus Reaktionsgefäß 4 nach Beispiel 7 (nach Inkubation eines OK1 Proteins mit ATP wurde das Protein mit 0,5 M NaOH inkubiert).

Fig. 3: Nachweis der Stärke phosphorylierenden Aktivität eines OK1 Proteins (siehe Beispiel 6). OK1 Protein wurde mit nicht-phosphorylierter-Stärke, isoliert aus Blättern einer *Arabidopsis thaliana* *sex1-3* Mutante (Ansatz A) und Stärke, isoliert aus Blättern einer *Arabidopsis thaliana* *sex1-3* Mutante, die nachträglich *in vitro* mit einem R1 Protein phosphoryliert wurde (Ansatz B) inkubiert. Ansatz C entspricht Ansatz B, außer dass dieser Ansatz C ohne OK1 Protein inkubiert wurde. Für jeden Ansatz (A, B, C) wurden je zwei unabhängige Versuche durchgeführt (Versuch 1 und Versuch 2). Graphisch dargestellt sind die jeweiligen Mengen, gemessen in cpm (Counts per minute), an  $^{33}\text{P}$  markiertem Phosphat, welches von dem OK1 Protein in nicht-phosphorylierte-Stärke (Ansatz A) und phosphorylierte Stärke (Ansatz B) eingeführt wurde.

15

Fig. 4: Vergleich der C-Atom-Positionen von Glucosemolekülen der Stärke, die von einem R1 Protein bzw. einem OK1 Protein phosphoryliert werden (siehe Beispiel 9). OK1 Protein (Ansatz A) wurde in Anwesenheit von mit  $^{33}\text{P}$  markierten ATP mit Stärke, isoliert aus Blättern einer *Arabidopsis thaliana* *sex1-3* Mutante, die nachträglich *in vitro* mit einem R1 Protein phosphoryliert wurde, inkubiert. ). R1 Protein (Ansatz B) wurde in Anwesenheit von mit  $^{33}\text{P}$  markierten ATP mit Stärke, isoliert aus Blättern einer *Arabidopsis thaliana* *sex1-3* Mutante inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurde eine Totalhydrolyse der Stärke durchgeführt und die erhaltenen Hydrolyseprodukte mittels HPAE Chromatographie aufgetrennt. Als Standard wurden den Hydrolyseprodukten vor der Auftrennung Glucose-6-Phosphat und Glucose-3-Phosphat zugegeben. Die mittels HPAE Chromatographie aufgetrennten Hydrolyseprodukte wurden in einzelnen Fraktionen aufgesammelt. Mit Fraktion 15 eluierte das zugegebene Glucose-6-Phosphat und mit Fraktion 17 das zugegebene Glucose-3-Phosphat. Die erhaltenen Fraktionen wurden anschließend auf das Vorliegen von radioaktiv markiertem Phosphat hin untersucht. Die in den

25  
30

einzelnen Fraktionen gemessene Menge an  $^{33}\text{P}$  markiertem Phosphat, gemessen in cpm (Counts per minute), welches von dem OK1 Protein oder dem R1 Protein jeweils in die Hydrolyseprodukte der phosphorylierten-Stärke eingeführt wurde, ist graphisch dargestellt.

5

Fig. 5 Nachweis der Autophosphorylierung des OK1 Proteins. Fig. 5 A) stellt einen Western Blot dar. Fig. 5 B) zeigt die Autoradiographie eines denaturierenden (SDS) Acrylamidgels. Auf beide Gele wurden jeweils die gleichen Proben zu gleichen Mengen aufgetragen. Das OK1 Protein wurde entweder mit randomisiertem radioaktiv markiertem ATP oder mit spezifisch in gamma-Position radioaktiv markiertem ATP inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurden die Proteine entweder auf 30°C oder 95°C erhitzt, oder in 0,5 M NaOH bzw. 0,5 M HCl inkubiert.

Fig. 6 Nachweis der Übertragung des beta-Phosphatrestes von ATP auf Stärke in einer von einem OK1 Protein katalysierten Reaktion. Es wurde zur Phosphorylierung von mittels eines R1 Proteins *in vitro* phosphorylierter Stärke, isoliert aus Blättern einer *Arabidopsis thaliana* *sex1-3* Mutante, durch ein OK1 Protein entweder spezifisch in gamma-Position mit  $^{33}\text{P}$  markiertes ATP oder randomisiertes  $^{33}\text{P}$  ATP eingesetzt. In den jeweiligen mit „control“ bezeichneten Experimenten wurde kein OK1 Protein zugegeben. Jeder Versuchsansatz wurde zweimal unabhängig voneinander durchgeführt. Die Ergebnisse beider Versuche sind dargestellt.

## Allgemeine Methoden

25

Im Folgenden werden Methoden beschrieben, welche zur Durchführung der erfindungsgemäßen Verfahren verwendet werden können. Diese Methoden stellen konkrete Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung dar, beschränken die

vorliegende Erfindung jedoch nicht auf diese Methoden. Dem Fachmann ist bekannt, dass er durch Modifikation der beschriebenen Methoden und/oder durch Ersetzen einzelner Methodenteile durch alternative Methodenteile die Erfindung in gleicher Weise ausführen kann.

5

## **1. Herstellung von Proteinextrakten aus pflanzlichen Gewebe**

### **a) Herstellung von Proteinextrakten aus pflanzlichen Geweben**

Blattmaterial wird sofort nach der Ernte in flüssigem Stickstoff eingefroren und daraufhin im Mörser unter flüssigem Stickstoff homogenisiert. Das zerkleinerte  
10 Blattmaterial wird mit dem ca. 3,5-fachen Volumen (bezogen auf das Gewicht des eingesetzten Blattmaterials) kaltem (4°C) Bindungspuffer versetzt und für 2x 10 s mit einem Ultraturrax (maximale Geschwindigkeit) aufgeschlossen. Nach der ersten Behandlung mit einem Ultraturrax wird das zerkleinerte Blattmaterial auf Eis abgekühlt, bevor die zweite Behandlung erfolgt. Anschließend wird das behandelte  
15 Blattmaterial durch ein 100 µm Nylonnetz gegeben und 20 min zentrifugiert (50 ml Zentrifugengefäß, 20.000xg, 4°C).

### **b) Ausfällen der in den Proteinextrakten enthaltenen Proteine**

Der nach Zentrifugation nach Schritt a) erhaltene Überstand wird abgenommen und  
20 sein Volumen bestimmt. Für das Ausfällen von Proteinen wird Ammoniumsulfat über einen Zeitraum von 30 Minuten kontinuierlich unter Rühren auf Eis bis zu einer Endkonzentration von 75% (Gewicht/Volumen) dem Überstand zugegeben. Anschließend wird der Überstand für eine weitere Stunde auf Eis unter Rühren inkubiert. Die aus dem Überstand ausgefällten Proteine werden bei 20.000xg und  
25 4°C für 10 min pelletiert und das Pellet anschließend in 5 ml Bindungspuffer aufgenommen, d.h. die im Pellet vorliegenden Proteine werden in Lösung gebracht.

### **c) Entsalzen der ausgefällten Proteine**

Die gelösten Proteine werden mittels einer mit Sephadex G25 gefüllten PD10-Säule (Amersham Bioscience, Freiburg, Prod. Nr. Säulen: 17-0851-01, Prod. Nr. Sephadex G25-M: 17-0033-01) bei einer Temperatur von 4°C entsalzt, d.h. auch das zur Ausfällung unter Schritt b) verwendete Ammoniumsulfat wird von den gelösten  
5 Proteinen abgetrennt. Die PD10-Säule wird vor dem Auftragen der nach Schritt b) in Lösung gebrachten Proteine mit Bindungspuffer äquilibriert. Dazu werden fünfmal jeweils 5 ml Bindungspuffer über die Säule gegeben. Anschließend werden pro Säule 2,5 ml der nach Schritt b) erhaltenen Proteinlösung auf die Säule gegeben, bevor Proteine mit 3,5 ml Bindungspuffer von der Säule eluiert werden.

10

d) Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wird mit einem Bradford-Essay (Biorad, München, Prod. Nr. 500-0006 bestimmt (Bradford, 1976, Anal. Biochem. 72, 248-254).

15 e) Zusammensetzung des Bindungspuffers [

Bindungspuffer:	50 mM	HEPES/NaOH (od. KOH), pH 7.2
	1 mM	EDTA
	2 mM	Dithioerythritol (DTE)
	2 mM	Benzamidin
20	2 mM	$\epsilon$ -Aminocaprinsäure
	0.5 mM	PMSF
	0.02 %	Triton X-100

2. Isolierung von Blattstärke

a) Isolierung von Stärkegranula aus pflanzlichen Geweben

25 Blattmaterial wird sofort nach der Ernte in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Blattmaterial wird im Mörser portionsweise unter flüssigem Stickstoff homogenisiert



und in insgesamt dem ca. 2,5-fachen Volumen (Gewicht/Volumen) Stärkepuffer aufgenommen. Diese Suspension wird zusätzlich noch einmal im Waring Blendor für 20 s bei maximaler Geschwindigkeit homogenisiert. Das Homogenisat wird durch ein Nylonnetz (100 µm Maschenweite) gegeben und 5 Minuten bei 1.000xg zentrifugiert.

5 Der Überstand mit den löslichen Proteinen wird verworfen.

b) Reinigung der Stärke, isoliert aus pflanzlichen Geweben

Das nach Schritt a) erhaltene Stärke enthaltende Pellet wird nach Entfernen des auf der Stärke oben aufliegenden grünen Materials durch abspülen des grünen Materials  
10 mit Stärkepuffer in Stärkepuffer aufgenommen und sukzessive durch Nylonnetze unterschiedlicher Maschenweite (in der Reihenfolge 60 µm, 30 µm, 20 µm) gegeben. Das Filtrat wird über ein 10 ml Percoll-Kissen (95% (v/v) Percoll (Pharmacia, Uppsala, Schweden), 5% (v/v) 0,5M HEPES-KOH pH7,2) zentrifugiert (Correx-Röhrchen, 15 min, 2.000xg) zentrifugiert. Das nach dieser Zentrifugation erhaltene  
15 Sediment wird einmal in Stärkepuffer resuspendiert und erneut zentrifugiert (5 min, 1.000xg.).

c) Entfernen der an die Stärke gebundenen Proteine

Nach Schritt b) werden Stärkegranula erhalten, welche an Stärke bindende Proteine  
20 enthalten. Die an die Oberfläche der Stärkegranula gebundenen Proteine werden durch viermalige Inkubation mit 0,5 % SDS (Natriumlaurylsulfat) für jeweils 10-15 Minuten bei Raumtemperatur unter Schütteln entfernt. Nach jedem Waschschrift erfolgt dabei ein Zentrifugation (5 min, 5.000xg), um die Stärkegranula vom betreffenden Waschpuffer abzutrennen.

25

d) Reinigung von Proteinen befreiter Stärke

Die nach Schritt c) erhaltene, von an ihre Oberfläche bindenden Proteinen befreiten Stärke, wird anschließend durch viermaliges Inkubieren mit Waschpuffer für jeweils

10-15 Minuten bei Raumtemperatur unter Schütteln entfernt. Nach jedem Waschschrift erfolgt dabei eine Zentrifugation (5 min, 1.000xg), um die Stärkegranula vom betreffenden Waschpuffer abzutrennen. Diese Reinigungsschritte dienen vor allem der Entfernung des bei Inkubationen nach Schritt c) eingesetzten SDS.

5

e) Bestimmung der Konzentration von isolierter Stärke

Die Menge der Stärke, isoliert nach Schritt d) wird photometrisch bestimmt. Die optische Dichte der Stärkesuspension wird nach geeigneter Verdünnung gegen eine Eichgerade bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen. Der lineare Bereich der  
10 Eichgerade befindet sich zwischen 0 und 0,3 Extinktionseinheiten.

Zur Erstellung der Eichgeraden wird Stärke, z.B. isoliert aus Blättern einer *Arabidopsis thaliana* *sex1-3* Mutante unter Vakuum getrocknet, gewogen und in einem definierten Volumen Wasser aufgenommen. Die so erhaltene Suspension wird in mehreren Schritten jeweils im Verhältnis 1 zu 1 mit Wasser verdünnt, bis man eine  
15 Suspension von ca. 5 µg Stärke pro ml Wasser enthält. Die durch die einzelnen Verdünnungsschritte erhaltenen Suspensionen werden im Photometer bei einer Wellenlänge von 600 nm vermessen. Die für die jeweiligen Suspensionen erhaltenen Absorptionswerte werden gegen die in der jeweiligen Suspension vorliegende Konzentration der Stärke aufgetragen. Die erhaltene Eichgerade sollte in dem  
20 Bereich von 0 µg Stärke pro ml Wasser bis 0,3 µg Stärke pro ml Wasser einer linearen mathematischen Funktion folgen.

f) Aufbewahrung isolierter Stärke

Die Stärke kann entweder direkt, ohne weitere Lagerung für weitere Versuche  
25 verwendet werden, oder in Aliquots in 1,5 mL Eppendorfgefäßen bei -20°C gelagert werden. Sowohl die eingefrorene Stärke, als auch nicht gelagerte, frisch isolierte Stärke kann gegebenenfalls z.B. für die in der vorliegenden Erfindung beschriebenen Methoden betreffend *in vitro*-Phosphorylierung und/oder Bindungstest eingesetzt werden.

g) Zusammensetzung von verwendeten Puffern

1x Stärkepuffer: 20 mM HEPES-KOH, pH 8.0

0.2 mM EDTA

5 0.5 % Triton X-100

Waschpuffer: 50 mM HEPES/KOH, pH 7,2

**3. Rekombinante Expression eines identifizierten Stärke phosphorylierenden Proteins**

- 10 a) Herstellung eines bakteriellen Expressionsvektors enthaltend eine cDNA, die ein Stärke phosphorylierendes Protein codiert

Die cDNA codierend ein Stärke phosphorylierendes Protein kann z.B. unter Verwendung von mRNA oder poly-A-plus-mRNA aus pflanzlichen Geweben als „Template“ mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) amplifiziert werden. Dazu wird  
15 zunächst eine reverse-Transkriptase für die Herstellung eines zur einem Stärke phosphorylierenden Protein codierenden mRNA komplementären cDNA Stranges verwendet, bevor der betreffende cDNA Strang mittels DNA-Polymerase amplifiziert wird. So genannte „Kits“ enthaltend Substanzen, Enzyme und Anleitungen zur Durchführung von PCR Reaktionen sind käuflich erwerbbar (z.B. SuperScript™ One-  
20 Step RT-PCR System, Invitrogen, Prod. Nr.: 10928-034. Die amplifizierte cDNA codierend ein Stärke phosphorylierendes Protein kann anschließend in einen bakteriellen Expressionsvektor, z.B. pDEST™17 (Invitrogen) kloniert werden. pDEST™17 enthält den T7 Promotor, der zur Initiation der Transkription von der T7-RNA-Polymerase verwendet wird. Weiterhin enthält der Expressionsvektor  
25 pDEST™17 in 5'-Richtung vom T7 Promotor eine Shine Dalgarno Sequenz gefolgt von einem Start-Codon (ATG) und von einem so genannten His-tag. Dieser His-tag besteht aus sechs direkt hintereinander folgenden Codons, die jeweils die

Aminosäure Histidin codieren und befindet sich in dem Leseramen des genannten Start Codons. Die Klonierung einer cDNA, codierend ein Stärke phosphorylierendes Protein in pDEST™17 erfolgt in der Weise, dass eine translationale Fusion zwischen den Codons für das Start Codon, den His-tag und der cDNA codierend ein Stärke  
5 phosphorylierendes Protein entsteht. Dadurch wird nach Transkription, initiiert am T7 Promotor und anschließender Translation ein Stärke phosphorylierendes Protein erhalten, welches an seinem N-Terminus zusätzliche Aminosäuren, beinhaltend den His-tag, enthält.

Es sind jedoch auch andere zur Expression in Mikroorganismen geeignete Vektoren  
10 zur Expression eines Stärke phosphorylierenden Proteins verwendbar. Expressionsvektoren und dazugehörige Expressionsstämme sind dem Fachmann bekannt und in geeigneter Kombination auch käuflich beim entsprechenden Fachhandel erwerbbar.

15 b) Herstellung von Expressionsklonen in *Escherichia coli*

Es wird zunächst ein entsprechender Transformations kompetenter *E. coli* Stamm, der eine T7-RNA-Polymerase chromosomal codiert mit dem nach Schritt a) hergestellten Expressionsplasmid transformiert und anschließend auf durch Agar verfestigtem Nährmedium über Nacht bei 30°C inkubiert. Als Expressionstamm  
20 eignen sich z.B. BL21 Stämme (Invitrogen Prod. Nr.: C6010-03 die eine T7-RNA-Polymerase unter Kontrolle eines mittels IPTG induzierbarem Promotor (*lacZ*) chromosomal codieren.

Aus der Transformation hervorgehende Bakterienkolonien können mit dem Fachmann bekannten Methoden daraufhin untersucht werden, ob sie das  
25 gewünschte Expressionsplasmid, enthaltend eine das Stärke phosphorylierende Protein codierende cDNA, enthalten. Es werden dabei Expressionsklone erhalten.

c) Expression eines Stärke phosphorylierenden Proteins in *Escherichia coli*

Zunächst wird eine Vorkultur hergestellt. Dazu wird ein Expressionsklon erhalten nach Schritt b) in 30 ml Terrific Broth (TB-Medium), enthaltend ein Antibiotikum zur Selektion auf Anwesenheit des Expressionsplasmides beimpft und über Nacht bei 30°C unter Schütteln (250 rpm) inkubiert.

- 5 Anschließend wird eine Hauptkultur zur Expression eines Stärke phosphorylierenden Proteins hergestellt. Dazu werden jeweils 1 Liter Erlenmeyer-Kolben, enthaltend jeweils 300 ml auf 30°C vorgewärmtes TB-Medium und ein Antibiotikum zur Selektion auf Anwesenheit des Expressionsplasmides mit jeweils 10 ml einer entsprechenden Vorkultur beimpft und bei 30°C unter Schütteln (250 rpm) bis zu  
10 einer Optischen Dichte (gemessen bei einer Wellenlänge von 600 nm; OD<sub>600</sub>) von ca. 0,8 inkubiert.

- Wurde zur Expression eines Stärke phosphorylierenden Proteins ein Expressionsplasmid verwendet, bei welchem die Expression des Stärke phosphorylierenden Proteins mittels eines induzierbaren Systems initiiert wird (z.B.  
15 der Expressionsvektor pDEST™17 in BL21 *E. coli* Stämmen, induzierbar mittels IPTG), so wird nach Erreichen einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,8 der in Hauptkultur der betreffende Induktor (z.B. IPTG) zugegeben. Nach Zugabe des Induktors wird die Hauptkultur bei 30°C unter Schütteln (250 rpm) inkubiert, bis eine OD<sub>600</sub> von ca. 1,8 erreicht ist. Anschließend wird die Hauptkultur für 30 Minuten auf Eis gekühlt, bevor  
20 die Zellen der Hauptkultur durch Zentrifugation (10 Minuten bei 4.000xg und 4°C) vom Kulturmedium abgetrennt werden.

#### **4. Reinigung eines Stärke phosphorylierenden Proteins**

- a) Aufschluss von ein Stärke phosphorylierendes Protein exprimierenden Zellen
- 25 Die nach Zentrifugation in Schritt c), Punkt 3 Allgemeine Methoden erhaltenen Zellen werden in Lysispuffer resuspendiert. Dabei werden ca. 4 ml Lysispuffer zu etwa 1 g Zellen gegeben. Anschließend werden die resuspendierten Zellen für 30 Minuten auf Eis inkubiert, bevor sie mit Hilfe einer Ultraschallsonde (Baudelin Sonoplus UW



2070, Baudelin electronic, Berlin, Einstellungen: Cycle 6, 70%, 1 Minute) unter ständiger Kühlung durch Eis aufgeschlossen werden. Dabei ist darauf zu achten, dass die Zellsuspension während der Ultraschallbehandlung nicht zu stark erwärmt wird. Die nach der Ultraschallbehandlung erhaltene Suspension wird Zentrifugiert (12  
5 Minuten bei 20.000xg, 4°C) und der nach Zentrifugation erhaltene Überstand wird durch einen Filter mit 45 µm Porengröße filtriert.

b) Reinigung des Stärke phosphorylierenden Proteins

Handelt es sich bei dem in *E. coli* Zellen exprimierten Stärke phosphorylierenden  
10 Protein um ein Fusionsprotein mit einem His-tag, so kann eine Aufreinigung mit Hilfe von Nickelionen erfolgen, an welches das His-tag mit hoher Affinität bindet. Dazu werden 25 ml des in Schritt d) erhaltenen Filtrates wird mit 1 ml Ni-Agarose-Slurry (Qiagen, Prod. Nr.: 30210) versetzt und für 1 Stunde auf Eis inkubiert. Anschließend wird das Gemisch aus Ni-Agarose-Slurry und Filtrat über eine Polystyren Säule  
15 (Pierce, Prod. Nr.: 29920) gegeben. Der Säulendurchlauf wird verworfen. Die Säule wird zunächst durch Aufgeben von 8 ml Lysispuffer gewaschen, wobei der Durchlauf erneut verworfen wird. Die Elution des Stärke phosphorylierenden Proteins erfolgt dann durch fraktioniertes Aufgeben von zweimal jeweils 1 ml E1-Puffer, gefolgt von einmal 1 ml E2-Puffer und anschließend von fünfmal jeweils 1 ml E3-Puffer auf die  
20 Säule. Der Durchlauf, der bei dem Aufgeben der einzelnen Fraktion der entsprechenden Elutionspuffer (E1-, E2-, E3-Puffer) auf die Säule anfällt, wird in voneinander getrennten Fraktionen aufgefangen. Aliquots dieser Fraktionen werden anschließend mittels denaturierender SDS-Acrylamidgelelektrophorese, gefolgt von einer Comassie-Blau Färbung analysiert. Die Fraktionen, welche das Stärke  
25 phosphorylierende Protein in ausreichender Menge und zufrieden stellender Reinheit enthalten, werden vereinigt und mit Hilfe von Druckfiltration bei 4°C aufkonzentriert. Die Druckfiltration kann z.B. mit Hilfe einer Amicon-Zelle (Amicon Ultrafiltration Cell, Model 8010, Prod. Nr.: 5121) bei Verwendung einer Diaflo PM30-Membran (Millipore, Prod. Nr.: 13212) bei 4°C erfolgen. Zur Konzentrierung können aber auch  
30 andere dem Fachmann bekannte Methoden verwendet werden.

c) Zusammensetzung verwendeter Puffer

Lysispuffer: 50 mM HEPES

300 mM NaCl

5 10 mM Imidazol

pH 8,0 (einstellen mit NaOH)

1 mg/ml Lysozym (direkt vor Verwendung des Puffers zugeben)

¼ Tablette pro 10 ml Proteaseinhibitoren Complete EDTA free, (Roche Produkt Nr.: 1873580) (direkt vor Verwendung des Puffers zugeben)

10

Elutionspuffer E1: 50 mM HEPES

300 mM NaCl

50 mM Imidazol

pH 8,0 (einstellen mit NaOH)

15

Elutionspuffer E2: 50 mM HEPES

300 mM NaCl

75 mM Imidazol

pH 8,0 (einstellen mit NaOH)

20

Elutionspuffer E3: 50 mM HEPES

300 mM NaCl

250 mM Imidazol

pH 8,0 (einstellen mit NaOH)

## **5. Rekombinante Expression eines R1 Proteins**

Die Rekombinante Expression eines R1 Proteins ist in der Literatur beschrieben (Ritte et al., 2002, PNAS 99, 7166-7171; Mikkelsen et al., 2004, Biochemical Journal  
5 377, 525-532), kann jedoch auch entsprechend der weiter oben unter Punkt 3. Allgemeine Methoden beschriebenen Methode betreffend die Rekombinante Expression eines Stärke phosphorylierenden Proteins durchgeführt werden.

## **6. Reinigung eines R1 Proteins**

10 Die Aufreinigung eines R1 Proteins ist in der Literatur beschrieben (Ritte et al., 2002, PNAS 99, 7166-7171; Mikkelsen et al., 2004, Biochemical Journal 377, 525-532), kann jedoch auch entsprechend der weiter oben unter Punkt 4. Allgemeine Methoden beschriebenen Methode betreffend die Reinigung eines Stärke phosphorylierenden Proteins durchgeführt werden, wenn durch Expression von R1 in  
15 *E. coli* Zellen ein R1 Fusionsprotein entsteht, welches einen His-tag enthält.

## **7. In vitro Herstellung von phosphorylierter-Stärke ausgehend von nicht-phosphorylierter-Stärke**

### **a) In vitro Phosphorylierung von nicht-phosphorylierter-Stärke**

20 Stärke, welche kein Stärkephosphat enthält (z.B. isoliert aus Blättern von *Arabidopsis thaliana* *sex1-3* Mutanten mit Hilfe der oben unter Punkt 2, Allgemeine Methoden beschriebenen Methode) wird mit R1 Puffer und mit gereinigtem R1 Protein (ca. 0,25 µg R1 Protein pro mg Stärke) versetzt, so dass sich ein Stärkegehalt von 25 mg pro ml ergibt. Dieser Reaktionsansatz wird über Nacht (ca. 15 h) bei Raumtemperatur  
25 unter Schütteln inkubiert. An die im Reaktionsansatz vorliegende Stärke gebundenes R1 wird nach Abschluss der Reaktion durch vier maliges Waschen mit jeweils ca.

800 µl 0,5 % SDS entfernt. Anschließend wird das noch in der *in vitro* phosphorylierten Stärke vorliegende SDS durch fünf maliges Waschen mit jeweils 1 ml Waschpuffer von entfernt. Alle Waschschriffe finden jeweils bei Raumtemperatur für 10 bis 15 Minuten unter Schütteln statt. Nach jedem Waschschriff erfolgt eine  
5 Zentrifugation (2 min, 10.000xg), um die Stärkegranula vom betreffenden SDS-Puffer oder Waschpuffer abzutrennen.

b) Zusammensetzung verwendeter Puffer

R1-Puffer:	50 mM	HEPES/KOH, pH 7,5
10	1 mM	EDTA
	6 mM	MgCl <sub>2</sub>
	0,5 mM	ATP

Waschpuffer: 50 mM HEPES/KOH, pH 7,2  
15

**8. Bindung von Proteinen an phosphorylierte-Stärke bzw. nicht-phosphorylierte-Stärke**

a) Isolierung von P-Stärke-Protein-Komplexen bzw. nicht-phosphorylierter-Stärke-Protein-Komplexen

20 Ca. 50 mg P-Stärke, bzw. ca. 50 mg nicht-phosphorylierte Stärke werden in getrennten Ansätzen jeweils in ca. 800 µl Proteinextrakt resuspendiert. Die Proteinkonzentration der Proteinextrakte sollte jeweils ca. 4 mg bis 5 mg pro ml betragen. Die Inkubation der P-Stärke bzw. nicht-phosphorylierten-Stärke mit Proteinextrakten wird bei Raumtemperatur für 15 Minuten unter Schütteln bei 4°C  
25 durchgeführt. Nach erfolgter Inkubation werden die Reaktionsansätze über ein Percoll-Kissen (4 ml) abzentrifugiert (15 Minuten, 3500 rpm, 4°C). Nicht an phosphorylierte Stärke bzw. P-Stärke gebundene Proteine befinden sich nach Zentrifugation im Überstand und können mit einer Pasteurpipette abgenommen

werde. Der Überstand wird verworfen. Das nach Zentrifugation erhaltene sedimentierte Pellet enthaltend P-Stärke und nicht-phosphorylierte-Stärke inclusive der an die betreffenden Stärken jeweils gebundene Proteine (P-Stärke-Protein-Komplexe bzw. nicht-phosphorylierter-Stärke-Protein-Komplexe), wird zweimal mit je  
5 1 ml Waschpuffer (siehe oben, Allgemeine Methoden unter Punkt 7.b)), durch Inkubation für jeweils 3 Minuten bei 4°C unter Schütteln gewaschen. Nach jedem Waschschrift erfolgt eine Zentrifugation (5 Minuten, 8000 rpm, 4°C in einer Tischzentrifuge, Hettich EBA 12R), um die P-Stärke, bzw. nicht-phosphorylierte-Stärke von dem Waschpuffer abzutrennen.

10

b) In Lösung bringen der in den P-Stärke-Protein-Komplexen bzw. nicht-phosphorylierter-Stärke-Protein-Komplexen gebundenen Proteinen

Die nach Schritt a) erhaltenen P-Stärke-Protein-Komplexe bzw. nicht-phosphorylierte-Stärke-Protein-Komplexe werden jeweils in ca. 150 µl SDS-  
15 Probenpuffer resuspendiert und 15 Minuten unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird die P-Stärke bzw. nicht-phosphorylierte-Stärke von den in Lösung gebrachten Proteinen durch Zentrifugation (1 Minute, 13.000 rpm, Raumtemperatur, Eppendorf Tischzentrifuge) abgetrennt. Der nach Zentrifugation erhaltene Überstand wird zur Entfernung jeglicher Reste von P-Stärke bzw. nicht-  
20 phosphorylierte-Stärke noch einmal zentrifugiert (1 Minute, 13.000 rpm, Raumtemperatur, Eppendorf Tischzentrifuge) und abgenommen. Es werden dadurch in Lösung gebrachte Proteine, die an P-Stärke bzw. nicht-phosphorylierte-Stärke binden, erhalten.

25 c) Zusammensetzung verwendeter Puffer

SDS-Probenpuffer: 187,5 mM Tris/HCl pH 6,8

6 % SDS

30 % Glycerin



~ 0,015 % Bromphenolblau

60 mM DTE (frisch zusetzen!)

5 Percoll: Percoll wird über Nacht gegen eine Lösung, bestehend aus und 25 mM  
HEPES / KOH, pH 7,0 dialysiert

**9. Auftrennung von Proteinen, die an P-Stärke und/oder nicht-phosphorylierte-Stärke binden**

Die nach Schritt c) unter Punkt 8. Allgemeine Methoden betreffend die Bindung von  
10 Proteinen an P-Stärke bzw. nicht-phosphorylierte-Stärke erhaltenen in Lösung  
gebrachten Proteine werden jeweils für 5 Minuten bei 95°C inkubiert und  
anschließend mit Hilfe denaturierender Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt.  
Dabei wird für die durch Bindung an P-Stärke und für die durch Bindung an nicht-  
phosphorylierte-Stärke erhaltenen in Lösung gebrachten Proteine jeweils ein  
15 gleiches Volumen auf das Acrylamidgel aufgetragen. Das nach erfolgter  
Elektrophorese erhaltene Gel wird mindestens über Nacht mit kolloidalem Comassie  
(Roth, Karlsruhe, Roti-Blue Rod. Nr.: A152.1) gefärbt und anschließend in 30 %  
Methanol, 5 % Essigsäure, oder in 25% Methanol entfärbt.

20 **10. Identifizierung und Isolierung von an P-Stärke und/oder nicht-phosphorylierte-Stärke bindenden Proteinen**

a) Identifizierung von Proteinen mit erhöhter Bindungsaktivität gegenüber P-Stärke  
im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke

Proteine, die, nach Auftrennung mittels Acrylamidgelelektrophorese und  
25 anschließender Sichtbarmachung durch Färbung (siehe oben, Punkt 9. Allgemeine  
Methoden), ein verstärktes Signal nach Bindung an P-Stärke im Vergleich zu einem  
entsprechenden Signal nach Bindung an nicht-phosphorylierte-Stärke zeigen, weisen

eine erhöhte Bindungsaktivität gegenüber P-Stärke im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke auf. Dadurch können Proteine, die eine erhöhte Bindungsaktivität gegenüber P-Stärke im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke aufweisen, identifiziert werden. Proteine, die eine erhöhte Bindungsaktivität  
5 gegenüber P-Stärke im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke aufweisen, werden aus dem Acrylamidgel ausgeschnitten.

b) Identifizierung der Aminosäuresequenz von Proteinen, die eine erhöhte Bindungsaktivität gegenüber P-Stärke im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke  
10 aufweisen

Nach Schritt a) identifizierte Proteine werden mit Trypsin verdaut und die erhaltenen Peptide zur Ermittlung der Massen der erhaltenen Peptide mittels MALDI-TOF analysiert. Trypsin ist eine sequenzspezifische Protease, d.h. Trypsin spaltet Proteine an einer vorgegebenen Stelle nur dann, wenn die betreffenden Proteine  
15 bestimmte Aminosäuresequenzen enthalten. Trypsin spaltet Peptidbindungen immer dann, wenn vom N-Terminus ausgehend die Aminosäuren Arginin und Lysin aufeinander folgen. Dadurch ist es möglich, sämtliche Peptide, die nach Trypsin Verdau einer Aminosäuresequenz entstehen würden, theoretisch zu ermitteln. Durch die Kenntnis der die theoretisch ermittelten Peptide codierenden Aminosäuren  
20 können auch die Massen der Peptide, die nach theoretischem Trypsin Verdau erhalten werden, ermittelt werden. Datenbanken (z.B. NCBI nr <http://prospector.ucsf.edu/ucsfhtml4.0/msfit.htm>; Swissprot <http://cbrg.inf.ethz.ch/Server/MassSearch.html>) die Informationen über die Massen von Peptiden nach theoretischem Trypsin Verdau enthalten, können daher mit den  
25 real mittels MALDI-TOF-MS erhaltenen Massen von Peptiden unbekannter Proteine verglichen werden. Aminosäuresequenzen, die gleiche Peptidmassen nach theoretischem und/oder realem Trypsin Verdau aufweisen, sind als identisch anzusehen. Die betreffenden Datenbanken enthalten sowohl Peptidmassen von Proteinen, deren Funktion bereits nachgewiesen wurde, als auch Peptidmassen von  
30 Proteinen, welche bisher nur hypothetisch durch Ableitung von

Aminosäuresequenzen ausgehend von in Sequenzierprojekten erhaltenen Nucleinsäuresequenzen existieren. Die tatsächliche Existenz und die Funktion solcher hypothetischen Proteine ist daher selten nachgewiesen und wenn überhaupt eine Funktion angegeben ist, dann beruht diese meist alleinig auf Vorhersagen, jedoch nicht auf einem tatsächlichen Nachweis der Funktion.

Banden, enthaltend nach Schritt a) identifizierte Proteine werden aus dem Acrylamidgel ausgeschnitten; das ausgeschnittene Acrylamidstück wird zerkleinert und durch Inkubation für ca. eine halbe Stunde bei 37°C in ca. 1 ml 60% 50mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , 40% Acetonitril entfärbt. Anschließend wird die Entfärbelösung abgenommen und das verbleibende Gel unter Vakuum (z.B. Speedvac) getrocknet. Nach Trocknung wird Trypsinlösung zum Verdau des in dem betreffenden Gelstück enthaltenen Proteins hinzu gegeben. Der Verdau erfolgt über Nacht bei 37°C. Nach dem Verdau wird wenig (bis das Acrylamidgel sich weißlich färbt) Acetonitril zugegeben und der Ansatz unter Vakuum (z.B. Speedvac) getrocknet. Nach erfolgter Trocknung wird so viel 5%ige Ameisensäure zugegeben, dass die getrockneten Bestandteile gerade bedeckt sind und für einige Minuten bei 37°C inkubiert. Die Behandlung mit Acetonitril gefolgt von der Trocknung wird einmal wiederholt. Anschließend werden die getrockneten Bestandteile in 0,1% TFA (Trifluoressigsäure, 5 µl bis 10 µl) aufgenommen und in ca. 0,5 µl Portionen auf einen Träger aufgetropft. Auf den Träger werden ebenfalls gleiche Mengen Matrix ( $\epsilon$ -Cyano-4-hydroxymethylsäure) aufgegeben. Nach Auskristallisieren der Matrix werden die Massen der Peptide mittels MALDI-TOF-MS-MS (z.B. Burker Reflex<sup>TM</sup> II, Bruker Daltonics, Bremen) ermittelt. Mit den erhaltenen Massen werden Datenbanken auf Aminosäuresequenzen hin durchsucht, welche nach theoretischem Trypsinverdau gleiche Massen ergeben. Somit können Aminosäuresequenzen identifiziert werden, welche Proteine codieren, die bevorzugt an phosphorylierte alpha-1,4-Glucose binden und/oder P-alpha-1,4-Glucose als Substrat benötigen.

## **11. Verfahren zum Nachweis von Stärke phosphorylierender Aktivität eines Proteins**

### **a) Inkubation von Proteinen mit P-Stärke und/oder nicht-phosphorylierter-Stärke**

Um nachzuweisen, ob ein Protein eine Stärke phosphorylierende Aktivität aufweist, können zu untersuchende Proteine mit Stärke und radioaktiv markiertem ATP inkubiert werden. Dazu werden ca. 5 mg P-Stärke bzw. ca. 5 mg nicht-phosphorylierte-Stärke mit dem zu untersuchenden Protein (0,01 µg bis 5,0 µg pro mg eingesetzter Stärke) in 500 µl Phosphorylierungspuffer für 10 Minuten bis 30 Minuten bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Anschließend wird die Reaktion durch Zugabe von SDS bis zu einer Konzentration von 2% (Gewicht/Volumen) gestoppt. Die im jeweiligen Reaktionsgemisch vorliegenden Stärkegranula werden abzentrifugiert (1 Minute, 13.000xg), einmal mit 900 µl einer 2 % SDS Lösung und jeweils viermal mit 900 µl einer 2 mM ATP Lösung gewaschen. Jeder Waschschrift wird für 15 Minuten bei Raumtemperatur unter Schütteln durchgeführt. Nach jedem Waschschrift werden die Stärkegranula durch Zentrifugation (1 Minute, 13.000xg) vom betreffenden Waschpuffer abgetrennt.

Zusätzlich sollten bei der Durchführung eines Experimentes zum Nachweis von Stärke phosphorylierender Aktivität eines Proteins weitere Reaktionsansätze, die kein Protein oder inaktiviertes Protein enthalten, ansonsten aber in gleicher Weise wie die beschriebenen Reaktionsansätze behandelt werden, als so genannte Kontrollen mitgeführt werden.

### **b) Ermittlung der Menge an durch enzymatische Aktivität in die P-Stärke und/oder nicht-phosphorylierte-Stärke eingebauten Phosphatreste**

Die nach Schritt a) erhaltenen Stärkegranula können auf das Vorliegen von radioaktiv markierten Phosphatresten hin untersucht werden. Dazu wird die jeweilige Stärke in je 100 µl Wasser resuspendiert und mit jeweils 3 ml Scintillationscocktail (z.B. Ready Safe™, BECKMANN Coulter) versetzt und anschließend mit Hilfe eines

Scintillationszählers (z.B. LS 6500 Multi-Purpose Scintillation Counter, BECKMANN COULTER™) analysiert.

- c) Identifizierung von Proteinen, die bevorzugt P-Stärke als Substrat verwenden
- 5 Wird ein Protein in getrennten Ansätzen einmal mit P-Stärke und einmal mit nicht-phosphorylierter-Stärke nach der unter a) beschriebenen Methode inkubiert, so kann durch Vergleich der nach Schritt b) erhaltenen Werte für das Vorliegen von Stärkephosphat ermittelt werden, ob das betreffende Protein mehr Phosphat in P-Stärke im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke eingebaut hat. Damit können
- 10 auch Proteine identifiziert werden, die Phosphat in P-Stärke, nicht jedoch in nicht-phosphorylierte-Stärke einführen können. D.h. es können Proteine identifiziert werden, die bereits phosphorylierte Stärke als Substrat für eine weitere Phosphorylierungsreaktion benötigen.

- 15 d) Zusammensetzung verwendeter Puffer

Phosphorylierungs-Puffer: 50 mM HEPES/KOH, pH 7,5

1 mM EDTA

6 mM MgCl<sub>2</sub>

0,01 bis 0,5 mM ATP

- 20 0,2 bis 2 µCi pro ml randomisiertes <sup>33</sup>P-ATP (alternativ kann auch ATP eingesetzt werden, welches einen spezifisch in beta-Position markierten Phosphatrest enthält)

- 25 Unter dem Begriff „randomisiertes ATP“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ATP verstanden werden, welches sowohl in gamma-Position, als auch in beta-Position markierte Phosphatreste enthält (Ritte et al. 2002, PNAS 99, 7166-



7171). Randomisiertes ATP wird in der wissenschaftlichen Literatur auch als Beta/gamma-ATP bezeichnet. Eine Methode zur Herstellung von randomisiertem ATP ist im Folgenden beschrieben.

i) Herstellung von randomisiertem ATP

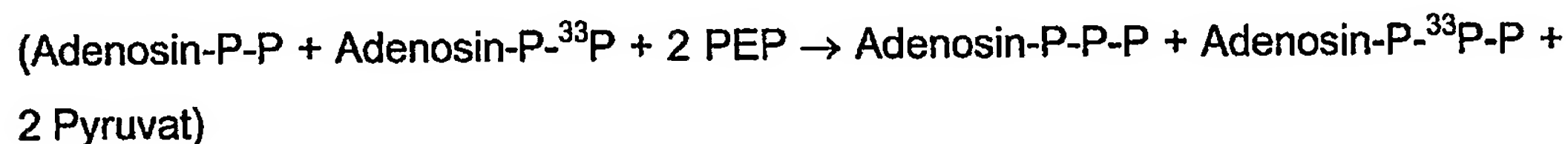
- 5 Der hier beschriebenen Methode zur Herstellung von randomisiertem ATP mit Hilfe von Enzym katalysierten Reaktionen liegen folgende Reaktionsmechanismen zu Grunde:

1. Reaktionsschritt:



- 10 (Adenosin-P-P-<sup>33</sup>P + Adenosin-P → Adenosin-P-P + Adenosin-P-<sup>33</sup>P)

2. Reaktionsschritt:



- 15 Die Reaktionsgleichgewichte liegen auf Produktseite, trotzdem entsteht bei dieser Reaktion eine Mischung aus größtenteils  $\beta^{33}\text{P-ATP}$  und etwas  $\gamma^{33}\text{P-ATP}$ .

ii) Durchführung des 1. Reaktionsschrittes

- ATP (100 µCi, 3000 Ci pro mmol), welches einen in gamma-Position mit <sup>33</sup>P  
20 markierten Phosphatrest enthält (Hartmann Analytic, 10 µCi/µl), wird mit 2 µl Myokinase (AMP-phosphotransferase, aus Kaninchen Muskel; SIGMA, Prod. Nr.: M3003 3,8 mg/ml, 1,626 Units/mg) in 90 µl Randomisierungspuffer für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wird die Reaktion durch Inkubation für 12 Minuten bei 95°C gestoppt, bevor der Reaktionsansatz mittels Zentrifugalfiltration über einen  
25 Microcon YM 10 Filter (Amicon, Millipore Prod. Nr. 42407) bei 14.000xg für mindestens 10 Minuten aufgereinigt wird.

iii) Durchführung des 2. Reaktionsschrittes

Dem in Schritt ii) erhaltenen Filtrat werden 2 µl Pyruvatkinase (zur Herstellung einer entsprechenden Lösung siehe unten) und 3 µl 50 mM PEP (Phosphoenolpyruvat) zugegeben. Dieses Reaktionsgemisch wird für 45 Minuten bei 30°C inkubiert, bevor  
5 die Reaktion durch Inkubation bei 95°C für 12 Minuten gestoppt wird. Anschließend wird das Reaktionsgemisch zentrifugiert (2 Minuten, 12.000 rpm in einer Eppendorftischzentrifuge). Der nach Zentrifugation erhaltene, randomisierte ATP enthaltende Überstand wird abgenommen, aliquotiert und kann bei -20°C gelagert werden.

10

Herstellung der Pyruvatkinase Lösung

15 µl Pyruvatkinase (aus Kaninchenmuskel, Roche, Prod. Nr. 12815), 10 mg/ml, 200 Units/mg bei 25 °C) werden abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 27 µl Pyruvatkinasepuffer aufgenommen.

15 iv) Verwendete Puffer

Pyruvatkinasepuffer:	50 mM	HEPES/KOH pH 7,5
	1 mM	EDTA

	Randomisierungspuffer:	100 mM	HEPES/KOH pH 7,5
20		1 mM	EDTA
		10 %	Glycerol
		5 mM	MgCl <sub>2</sub>
		5 mM	KCl
		0,1 mM	ATP
25		0,3 mM	AMP

## **12. Nachweis der Autophosphorylierung eines Proteins**

Um nachzuweisen, ob ein Protein eine autophosphorylierende Aktivität aufweist, können zu untersuchende Proteine mit radioaktiv markiertem ATP inkubiert werden. Dazu werden zu untersuchende Proteine (50 µg bis 100 µg) in 220 µl  
5 Phosphorylierungspuffer (siehe oben, Punkt 12 d), Allgemeine Methoden) für 30 Minuten bis 90 Minuten bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Anschließend wird die Reaktion durch Zugabe von EDTA bis zu einer Endkonzentration von 0,11 M gestoppt. Ca. 2 µg bis 4 µg Protein werden mit Hilfe denaturierender Polyacrylamidgelelektrophorese (7,5%iges Acrylamidgel) aufgetrennt. Das nach  
10 Polyacrylamidgelelektrophorese erhaltene Gel wird einer Autoradiographie unterzogen. Proteine, die in der Autoradiographie ein Signal zeigen, tragen einen radioaktiven Phosphatrest.

## **13. Identifizierung der C-Atom-Positionen der Glucosemoleküle eines alpha-1,4-Glucans, in welche Phosphatreste durch ein Stärke phosphorylierendes Protein eingeführt werden**

Welche C-Atom-Positionen der Glucosemoleküle eines alpha-1,4-Glucans von einem Protein phosphoryliert werden, kann durch Hydrolyse der durch ein betreffendes Protein *in vitro* phosphorylierten erhaltenen Glucane, anschließender Auftrennung  
20 der nach Hydrolyse erhaltenen Glucosemonomere, gefolgt von Messung des durch ein betreffendes Protein eingebautes Phosphat in bestimmte Fraktionen der Glucosemoleküle geführt nachgewiesen werden.

### **a) Totalhydrolyse der alpha-1,4-Glucane**

25 Alpha-1,4-Glucan enthaltende Wasser-Suspensionen werden zentrifugiert, das sedimentierte Pellet anschließend in 0,7 M HCl (Baker, zur Analyse) resuspendiert und unter Schütteln für 2 Stunden bei 95°C inkubiert. Nach erfolgter Inkubation werden die Proben kurz abgekühlt und zentrifugiert (z.B. 2 Minuten 10.000xg). Der

erhaltene Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und durch Zugabe von 2 M NaOH (Baker, zur Analyse) neutralisiert. Falls ein Pellet zurück bleibt, wird es in 100 µl Wasser resuspendiert und die Menge des darin vorliegenden markierten Phosphates zur Kontrolle bestimmt.

- 5 Der neutralisierte Überstand wird anschließend über einen 10 kDa Filter zentrifugiert. Durch Messung eines Aliquots des erhaltenen Filtrates wird die Menge an markiertem Phosphat im Filtrat z.B. mit Hilfe eines Scintillationszählers bestimmt.

10 b) Fraktionierung der Hydrolyseprodukte und Ermittlung der phosphorylierten C-Atom Positionen

Die mittels Schritt a) erhaltenen neutralisierten Filtrate der Hydrolyseprodukte können (bei Verwendung von radioaktiv markiertem ATP etwa 3.000 cpm) mit Hilfe von z.B. Hoch-Druck-Anionenaustausch-Chromatographie (HPAE) aufgetrennt werden. Zur Einstellung des für die HPAE benötigten Volumens kann das neutralisierte Filtrat mit 15 H<sub>2</sub>O verdünnt werden. Weiterhin wird den entsprechenden Filtraten als interne Kontrolle jeweils Glucose-6-Phosphat (ca. 0,15 mM) und Glucose-3-Phosphat (ca. 0,3 mM) zugegeben. Die Auftrennung mittels HPAE kann z.B. mit Hilfe einer Dionex Anlage DX 600 Bio Lc unter Verwendung einer CarboPac PA 100 Säule (mit entsprechender Vorsäule) und eines gepulsten amperometrischen Detektors (ED 50) 20 Detektors erfolgen. Dabei wird vor Injektion der Probe die Säule zunächst für 10 Minuten mit 99% Eluent C und 1% Eluent D gespült. Anschließend werden jeweils 60 µl Probenvolumen injiziert. Die Elution der Probe erfolgt durch folgende Bedingungen:

Flußrate: 1 ml pro Minute

- 25 Gradient: linear ansteigend von 0 Minuten bis 30 Minuten

	Eluent C	Eluent D
0 Minuten	99%	1%
30 Minuten	0%	100%

35 Minuten      0%      100%

Stop des Laufes

Die von der Säule eluierten Hydrolyseprodukte werden in einzelnen Fraktionen von  
5 je 1 ml aufgefangen. Da den injizierten Proben der Hydrolyseprodukte jeweils nicht  
markiertes Glucose-3-Phosphat (Ritte et al. 2002, PNAS 99, 7166-7171) und nicht  
markiertes Glucose-6-Phosphat (Sigma, Prod. Nr.: G7879) als interne Standards  
zugemischt wurden, können mittels gepulster amperometrischer Detektion die  
Fraktionen ermittelt werden, welche entweder Glucose-3-Phosphat oder Glucose-6-  
10 Phosphat enthalten. Durch Messung der Menge an markierten Phosphaten in den  
einzelnen Fraktionen und anschließendem Vergleich mit den Fraktionen, welche  
Glucose-3-Phosphat oder Glucose-6-Phosphat enthalten, können damit diejenigen  
Fraktionen ermittelt werden, in welchen markiertes Glucose-6-Phosphat oder  
markiertes Glucose-3-Phosphat enthalten ist. Die Menge des markierten Phosphates  
15 in den betreffenden Fraktion wird bestimmt. Durch die Verhältnisse der für markiertes  
Phosphat gemessenen Mengen an Glucose-3-Phosphat zu Glucose-6-Phosphat in  
den einzelnen Hydrolyseprodukten, kann nun ermittelt werden, welche C-Atom-  
Position von einem alpha-1,4-Glucan phosphorylierenden Enzym bevorzugt  
phosphoryliert wird.

20

c) Verwendete Puffer

Eluent C: 100 mM NaOH

Eluent D: 100 mM NaOH

500 mM Natriumacetat

25

**14. Vorbereitung der Proben für die Sequenzierung mittels Q-TOF-MS-MS**

a) Allgemeines



Isolierte Proteine, die auch in Form von aus Polyacrylamidgelen ausgeschnittenen Banden vorliegen können, werden zunächst mittels eines Trypsinverdaus in kleinere Fragmente gespalten. Die entstandenen Peptide werden in ein Hybridmassenspektrometer, bei dem ein Flugzeitmassenspektrometer (Time-of-flight-, TOF) an ein Quadrupol-Massenspektrometer gekoppelt ist, aufgebracht. In der ersten Phase des Messens ist das erste Massenspektrometer (das Quadrupol) „ausgeschaltet“ und die Massen der im Verdau entstandenen Peptide können im TOF-Massenspektrometer gemessen werden. In der zweiten Phase wird ein ausgewähltes Peptid im Quadrupol „ausgefiltert“, d.h. nur dieses Peptid kann das Quadrupol passieren, alle anderen werden abgelenkt. Das Peptid wird anschließend in der „Stoßzelle“ durch Zusammenstoßen mit geladenen Gasmolekülen zerbrochen. Die „Brüche“ treten dabei hauptsächlich an den Peptidbindungen auf. Dadurch entstehen mehr oder weniger statistisch verteilte Peptidbruchstücke, die sich in der Masse unterscheiden. Durch „Sortieren“ dieser Bruchstücke kann dann die Aminosäuresequenz der Peptide bestimmt werden. Erhält man sich überlappende Peptide, so kann daher auch die Aminosäuresequenz eines Proteins bestimmt werden. Die Verwendung von Massenspektroskopie zur Identifizierung und Sequenzierung ist dem Fachmann bekannt und ausreichend in der Fachliteratur beschrieben [z.B. P. Michael Conn (Ed.), 2003, Humana Press, New Jersey, ISBN: 1-58829-340-8]; J.R. Chapman (Ed.), 2000, Humana Press, SBN: 089603609X].

b) Reduktion und Alkylierung von Cysteinresten von Proteinen

Die Cysteinreste enthaltend in den Aminosäuresequenzen der zu analysierenden Proteine können bereits vor der Auftrennung der Proteine mittels Gelelektrophorese reduziert/alkyliert werden. Dazu werden die Proteine, welche mittels Gelelektrophorese aufgetrennt werden sollen, mit SDS-Probenpuffer (darf kein DTT oder beta-Mercaptoethanol enthalten) versetzt. Anschließend wird diesen Proben frisch angesetztes DTT bis zu einer Endkonzentration von 10 mM zugegeben und die Probe für 3 Minuten bei 95°C inkubiert. Nach Abkühlen der Probe auf Raumtemperatur erfolgt die Zugabe von frisch angesetztem Jodacetamid bis zu einer

Endkonzentration von 20 mM. Die Probe wird für 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend werden die in den Proben vorliegenden Proteine mittels Acrylamidgelelektrophorese aufgetrennt.

5 c) Isolierung der Proteine aus dem Acrylamidgel

Proteinbanden, die Proteine enthalten, dessen Sequenz ermittelt werden sollen, werden mit einem sauberen Skalpell möglichst „randlos“ ausgeschnitten und zerkleinert (ca. 1 mm<sup>3</sup>-Würfel). Die zerkleinerten Gelstücke werden in ein 0,5 ml oder 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und durch kurze Zentrifugation sedimentiert.

10

d) Entfärben der ausgeschnittenen Gelstücke

15 Wurden mittels Silberionen gefärbte Gele verwendet, so werden die nach Schritt c) erhaltenen Gelstücke mit einer Lösung enthaltend 30 mM K-Ferricyanid und 100 mM Na-Thiosulfat im Verhältnis 1:1 vollständig bedeckt und solange geschüttelt (Vortex), bis die Gelstücke vollständig entfärbt sind. Anschließend wird die Entfärbelösung abgenommen und die Gelstücke werden je dreimal mit je 200 µl Reinstwasser (Leitfähigkeit ca. 18 MOhm) gewaschen.

20 Wurden mittels Comassie Blau gefärbte Gele verwendet, so werden die nach Schritt c) erhaltenen Gelstücke mit einer Lösung enthaltend Reinstwasser und Acetonitril (Reinheitsgrad: mindestens HPLC rein) im Verhältnis 1:1 je zweimal für 15 Minuten unter Schütteln inkubiert. Das Volumen der Entfärbelösung sollte ca. dem zweifachen Volumen des Gels entsprechen. Die Waschlösung wird nach jedem Waschschrift abgenommen.

25 Nach erfolgter Entfärbung werden die Gelstücke mit einem Volumen (bezogen auf die Gelstücke) Acetonitril versetzt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Das Acetonitril wird abgenommen und die Gelstücke mit einem Volumen 100 mM Ammoniumbicarbonat versetzt, gemischt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgt die Zugabe von Acetonitril, so dass

sich ein Verhältnis von 1:1 bezogen auf die Menge vom Ammoniumbicarbonat und Acetonitril, einstellt. Es wird für weitere 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, bevor die Lösung abgenommen wird und die verbleibenden Gelstücke unter Vakuum getrocknet werden (z.B. Speedvac).

5

e) Trypsinverdau der Proteine in den Gelstücken

Zu den trockenen Gelstücken, erhalten nach Schritt d), wird Trypsinlösung (10 ng Trypsin pro  $\mu\text{l}$  50 mM Ammoniumbicarbonat) in 10  $\mu\text{l}$  Portionen zugeben. Nach jeder Zugabe von Trypsinlösung erfolgt eine Inkubation auf Eis für jeweils 10 Minuten. Es  
10 wird solange portionsweise Trypsinlösung hinzu gegeben, bis die Gelstücke nicht weiter quellen und von Trypsinlösung vollständig bedeckt sind. Anschließend wird die Trypsinlösung entfernt und die Gelstücke über Nacht bei 37°C inkubiert.

f) Isolierung der Peptide aus dem Acrylamidgel

15 Die nach Schritt e) erhaltenen Proben werden kurz zentrifugiert, um die im Reaktionsgefäß enthaltene Flüssigkeit zu sammeln, die Flüssigkeit wird abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Gelstücke werden für 2 Minuten mit Ultraschall behandelt (Ultraschallwasserbad). Anschließend werden die zurückbleibenden Gelstücke mit dem einfachen ihres Volumens 25 mM  
20 Ammoniumbicarbonatlösung versetzt und für 20 Minuten unter Schütteln inkubiert. Anschließend wird Acetonitril hinzu gegeben, so dass sich ein Verhältnis von Ammoniumbicarbonat zu Acetonitril von 1:1 einstellt und unter Schütteln bei Raumtemperatur für weiter 15 Minuten inkubiert. Nach erfolgter Inkubation werden die Proben erneut für 2 Minuten mit Ultraschall behandelt, bevor die Flüssigkeit  
25 abgenommen und mit der zuvor abgenommenen Flüssigkeit vereinigt wird. Die verbleibenden Gelstücke werden mit dem einfachen ihres Volumens einer Lösung enthaltend 5% Ameisensäure und Acetonitril im Verhältnis 1:1 versetzt und für 15 Minuten unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Die Flüssigkeit wird abgenommen und mit den zuvor abgenommenen Flüssigkeiten vereint. Die

Inkubation der Gelstücke in 5% Ameisensäure / Acetonitril (Verhältnis 1:1) wird wiederholt und die erhaltene Flüssigkeit ebenfalls zu den vorher gesammelten Flüssigkeiten gegeben. Die vereinigten Überstände enthalten die zu sequenzierenden Peptide und werden in der Vakuumzentrifuge (Speedvac) bei 60°C  
5 auf ca. 15 µl eingengt. Die so erhaltenen Peptide können bei 20°C bis zur Analyse mittels Q-TOF gelagert werden. Bevor die Proteine in der Massenanalyse sequenziert werden können sie nach dem Fachmann bekannten Methoden entsalzt werden.

#### 10 15. Transformation von Reispflanzen

Reispflanzen wurden nach der von Hiei et al. (1994, Plant Journal 6(2), 271-282) beschriebenen Methode transformiert.

#### 16. Transformation von Kartoffelpflanzen

15 Kartoffelpflanzen wurden mit Hilfe von Agrobakterium, wie bei Rocha-Sosa et al. (EMBO J. 8, (1989), 23-29) beschrieben, transferiert.

#### 17. Bestimmung des Gehaltes an Stärkephosphat

##### a) Bestimmung des C-6-Phosphatgehaltes

20 In der Stärke können die Positionen C2, C3 und C6 der Glukoseeinheiten phosphoryliert sein. Zur Bestimmung des C6-P-Gehaltes der Stärke werden 50 mg Stärke in 500 µl 0,7 M HCl 4 h bei 95°C hydrolysiert. Anschließend werden die Ansätze für 10 min bei 15500 g zentrifugiert und die Überstände abgenommen. Von den Überständen werden 7µl mit 193 µl Imidazol-Puffer (100 mM Imidazol, pH 7,4; 5  
25 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA und 0,4 mM NAD) gemischt. Die Messung wurde im Photometer bei 340 nm durchgeführt. Nach der Etablierung einer Basisabsorption

wurde die Enzymreaktion durch die Zugabe von 2 Einheiten (units) Glukose-6-Phosphat Dehydrogenase (von Leuconostoc mesenteroides, Boehringer Mannheim) gestartet. Die Absorptionsänderung ist direkt proportional zur Konzentration des G-6-P Gehaltes der Stärke.

5

b) Bestimmung des Gesamtphosphatgehaltes

Die Bestimmung des Gesamtphosphatgehaltes erfolgte nach der Methode von Ames (Methods in Enzymology VIII, (1966), 115-118).

10 Es werden ca. 50 mg Stärke mit 30 µl ethanolischer Magnesiumnitrat-Lösung versetzt und drei Stunden bei 500°C im Muffelofen verascht. Der Rückstand wird mit 300 µl 0,5 M Salzsäure versetzt und 30 min bei 60°C inkubiert. Anschließend wird ein Aliquot auf 300 µl 0,5 M Salzsäure aufgefüllt, zu einer Mischung aus 100 µl 10%iger Ascorbinsäure und 600 µl 0,42% Ammoniummolybdat in 2 M Schwefelsäure gegeben und 20 min bei 45°C inkubiert.

15

c) Bestimmung des Gehaltes an C-6-Phosphat und C-3-Phosphat

Zur Bestimmung des Gehaltes an Phosphat, welcher in C-6-Position und in C-3-Position der Glucosemoleküle eines alpha-1,4-Glucans gebunden ist, können die betreffenden Glucane nach Totalhydrolyse nach der unter Allgemeine Methoden 13  
20 angeführten Methode mittels HPAE aufgetrennt werden. Die Mengen an Glucose-6-Phosphat und Glucose-3-Phosphat können durch Integration der einzelnen, nach HPEA Auftrennung erhaltenen Peakflächen ermittelt werden. Durch Vergleich der erhaltenen Peakflächen für Glucose-6-Phosphat und Glucose-3-Phosphat in  
25 bekannten Mengen an Glucose-6-Phosphat und Glucose-3-Phosphat erhalten werden, kann die Menge von Glucose-6-Phosphat und Glucose-3-Phosphat in den zu untersuchenden Proben bestimmt werden.



## **Beispiele**

1. **Isolierung eines Proteins aus *Arabidopsis thaliana*, welches eine erhöhte Bindungsaktivität gegenüber P-Stärke im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke aufweist**

- 5 a) **Herstellung von Proteinextrakten aus *Arabidopsis thaliana***

Proteinextrakte wurden aus etwa 7 g Blättern (Frischgewicht) von *Arabidopsis thaliana* (Ökotyp Columbia, Col-O) nach dem unter Punkt 1, Allgemeine Methoden beschriebenen Verfahren hergestellt.

- 10 b) **Isolierung von Stärkegranula aus Blättern von *sex1-3* Mutanten von *Arabidopsis thaliana***

Stärkegranula wurden aus etwa 20 g (Frischgewicht) aus Blättern einer *sex1-3* Mutante von *Arabidopsis thaliana* nach dem unter Punkt 2., Allgemeine Methoden beschriebenen Verfahren isoliert.

15

- c) ***In vitro* Phosphorylierung von Stärke, isoliert aus einer *sex1-3* Mutante von *Arabidopsis thaliana* mit gereinigtem R1 Protein**

Etwa 30 mg nicht-phosphorylierte-Stärke, isoliert aus einer *sex1-3* Mutante von *Arabidopsis thaliana* wurde nach dem unter Punkt 7., Allgemeine Methoden beschriebenen Verfahren mittels eines rekombinant in *E. coli* exprimierten und gereinigten R1 Proteins phosphoryliert. Zur Expression des R1 Proteins in *E. coli* und zur anschließenden Aufreinigung wurden die bei Ritte et al. (2002, PNAS 99, 7166-7171) beschriebenen Verfahren verwendet.

- 25 d) **Isolierung von Proteinen, die an P-Stärke und/oder nicht-phosphorylierte-Stärke binden**

Proteinextrakte von *Arabidopsis thaliana*, erhalten nach Schritt a) wurden in einem Ansatz A mit 50 mg der nach Schritt c) hergestellten *in vitro* phosphorylierten Stärke nach dem unter Punkt 8 a), Allgemeine Methoden beschriebenen Verfahren inkubiert und gewaschen.

- 5 In einem zweiten Ansatz B wurden Proteinextrakte von *Arabidopsis thaliana*, erhalten nach Schritt a) mit 50 mg der nach Schritt b) hergestellten nicht-phosphorylierten-Stärke nach dem unter Punkt 8 a), Allgemeine Methoden beschriebenen Verfahren inkubiert und gewaschen.

- 10 Anschließend wurden die an P-Stärke des Ansatzes A und die an nicht-phosphorylierte-Stärke des Ansatzes B nach dem unter Punkt 8 b), Allgemeine Methoden beschriebenen Verfahren in Lösung gebracht.

- In einem dritten Ansatz C wurden 50 mg der nach Schritt c) hergestellten *in vitro* phosphorylierten Stärke nach dem unter Punkt 8 a), Allgemeine Methoden beschriebenen Verfahren inkubiert und gewaschen. Ansatz C enthielt jedoch keinen  
15 Proteinextrakt.

e) Auftrennung der nach Schritt d) erhaltenen Proteine mittels Acrylamidgelelektrophorese

- Die in Schritt d) erhaltenen Proteine der Ansätze A, B und C wurden mittels einem  
20 9%igem Acrylamidgel unter denaturierenden Bedingungen (SDS) nach dem unter Punkt 9., Allgemeine Methoden beschriebenen Verfahren aufgetrennt und anschließend mit Comassie Blau gefärbt. Das gefärbte Gel ist in Fig. 1 dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass ein Protein, welches im denaturierenden Acrylamidgel bezogen auf eine Proteinstandardmarker (Spur M) ein Molekulargewicht von ca. 130  
25 kDa aufweist, bevorzugt an phosphorylierte Stärke (Spur P) im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke (K) bindet.

f) Identifizierung des Proteins, das bevorzugt an P-Stärke im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke bindet

Die in Schritt e) identifizierte Bande des Proteins mit einem Molekulargewicht von ca. 130 kDa wurde aus dem Gel ausgeschnitten. Anschließend wurde das Protein wie unter Allgemeine Methoden 10 b) beschrieben, aus dem Acrylamid herausgelöst, mit Trypsin verdaut und die erhaltenen Peptidmassen mittels MALD-TOF-MS bestimmt. Der durch MALDI-TOF-MS erhaltene so genannte „Fingerprint“ wurde mit in Datenbanken (Mascot: [http://www.matrixscience.com/search\\_form\\_select.html](http://www.matrixscience.com/search_form_select.html); ProFound: [http://129.85.19.192/profound\\_bin/WebProFound.exe](http://129.85.19.192/profound_bin/WebProFound.exe); PepSea: <http://195.41.108.38/PepSeaIntro.html>) enthaltenen Fingerprints theoretisch verdauter Aminosäuremoleküle verglichen. Da ein solcher Fingerprint sehr spezifisch für ein Protein ist, konnte ein Aminosäuremolekül identifiziert werden. Mit Hilfe der Sequenz dieses Aminosäuremoleküls konnte eine ein OK1 Protein codierende Nucleinsäuresequenz aus *Arabidopsis thaliana* isoliert werden. Das mit diesem Verfahren identifizierte Protein wurde mit A.t.-OK1 bezeichnet. Nach Analyse der Aminosäuresequenz des OK1 Proteins aus *Arabidopsis thaliana*, ergab sich, dass diese von der in der Datenbank vorliegenden Sequenz (NP 198009, NCBI) abweicht. Die in SEQ ID No 2 dargestellte Aminosäuresequenz codiert das A.t.-OK1 Protein. SEQ ID No 2 enthält im Vergleich mit der Sequenz der Datenbank (Acc.: NP 198009.1, NCBI) Abweichungen. Die in SEQ ID No 2 enthaltenen Aminosäuren 519 bis 523 (WRLCE) und 762 bis 766 (VRARQ) sind nicht in der Sequenz, welche in der Datenbank vorliegt (ACC.: NP 198009.1) enthalten. Gegenüber der Version 2 der Datenbanksequenz (Acc.: NP 198009.2) enthält die in SEQ ID NO 2 dargestellte Aminosäuresequenz noch die zusätzlichen Aminosäuren 519 bis 523 (WRLCE).

## 2. Klonierung einer cDNA, die das identifizierte OK1 Protein codiert

Die A.t.-OK1 cDNA wurde mit Hilfe reverser PCR unter Verwendung von mRNA, isoliert aus Blättern von *Arabidopsis thaliana* isoliert. Dazu wurde ein cDNA Strang mittels reverser Transkriptase SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT PCR, Invitrogen Prod. Nr.: 11904-018) synthetisiert, welcher dann unter Verwendung

von DNA Polymerase amplifiziert (Expand High Fidelity PCR Systems, Roche Prod. Nr.: 1732641) wurde. Das erhaltene Amplifikat dieser PCR Reaktion wurde in den Vektor pGEM<sup>®</sup>-T (Invitrogen Prod. Nr.: A3600) kloniert. Das erhaltene Plasmid wird mit A.t.-OK1-pGEM<sup>®</sup>-T bezeichnet, die das A.t.-OK1 Protein codierende cDNA  
5 Sequenz wurde ermittelt und ist unter SEQ ID NO. 1 dargestellt.

Die unter SEQ ID NO 1 dargestellte Sequenz entspricht nicht der Sequenz, die in der Datenbank enthalten ist. Diese wurde oben bereits für die Aminosäuresequenz, codierend ein A.t.-OK1 Protein diskutiert.

Verwendete Bedingungen für die Amplifikation der cDNA codierend das A.t.-OK1  
10 Proteins

Erststrangsynthese:

Es wurden die vom Hersteller angegebenen Bedingungen und Puffer verwendet. Der Reaktionsansatz für die Erststrangsynthese enthielt außerdem folgende Substanzen:

3 µg Gesamt-RNA  
15 5 µM 3'-Primer (OK1rev1: 5'-GACTCAACCACATAACACACAAAGATC)  
0,83 µM dNTP Mix

Der Reaktionsansatz wurde für 5 Minuten bei 75°C inkubiert und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt.

Anschließend wurden 1<sup>st</sup> Strand buffer, RNase Inhibitor und DTT zugegeben und für  
20 2 Minuten bei 42°C inkubiert, bevor 1 µL Superscript RT DNA Polymerase zugegeben wurde und der Reaktionsansatz für 50 Minuten bei 42°C inkubiert wurde.

Bedingungen Für die Amplifikation des Erststranges mittels PCR:

1 µL des Reaktionsansatzes der Erststrangsynthese  
0.25 µM 3'Primer (OK1rev2: 5'- TGGTAACGAGGCAAATGCAGA)  
25 0.25 µM 5'Primer (OK1fwd2: 5'- ATCTCTTATCACACCACCTCCAATG)

Reaktionsbedingungen:

- Schritt 1     95°C 2 min  
Schritt 2     94°C 20 sec  
Schritt 3     62°C 30 sec  
Schritt 4     68°C 4 Minuten  
5 Schritt 5     94°C 20 sec  
Schritt 6     56°C 30 sec  
Schritt 7     68°C 4 Minuten  
Schritt 8     68°C 10 Minuten

Zunächst wurde die Reaktion nach den Schritten 1 bis 4 durchgeführt. Zwischen  
10 Schritt 4 und Schritt 2 folgten 10 Wiederholungen (Zyklen), wobei die Temperatur  
des Schrittes 3 nach jedem Zyklus um 0,67°C verringert wurde. Anschließend  
erfolgte die Reaktion nach den in Schritten 5 bis 8 angegebenen Bedingungen.  
Zwischen Schritt 7 und Schritt 5 folgten 25 Wiederholungen (Zyklen), wobei die Zeit  
des Schrittes 7 je Zyklus um 5 sec verlängert wurde. Nach erfolgter Reaktion wurde  
15 die Reaktion auf 4°C gekühlt.

### **3. Herstellung eines Vektors, zur rekombinanten Expression der cDNA des OK1 Proteins**

Die Sequenz codierend das OK1 Protein aus *Arabidopsis thaliana* wurde nach  
Amplifikation mittels PCR durch Verwendung des Plasmides A.t.-OK1-pGEM®-T als  
20 Template unter Verwendung der Gateway Technologie (Invitrogen) zunächst in den  
Vektor pDONOR™ 201 (Invitrogen Prod. Nr.: 11798-014) kloniert. Anschließend  
wurde die codierende Region des OK1 Proteins aus dem erhaltenen Vektor durch  
sequenzspezifische Rekombination in den Expressionsvektor pDEST17™ (Invitrogen  
Prod. Nr.: 11803-014) kloniert. Der erhaltene Expressionsvektor wird mit A.t.-OK1-  
25 pDEST™17 bezeichnet. Durch die Klonierung entstand eine translationale Fusion der  
das A.t.-OK1 Protein codierenden cDNA mit in dem Expressionssvektor pDEST™17  
vorliegenden Nucleotiden. Die aus dem Vektor pDEST™17 stammenden Nucleotide,



die mit der cDNA codierend das A.t.-OK1 Protein translational fusioniert sind, codieren 21 Aminosäuren. Diese 21 Aminosäuren umfassen u.a. das Start Codon (ATG) und einen so genannten His-tag (6 Histidinreste direkt hintereinander). Nach Translation dieser translational fusionierten Sequenzen entsteht dadurch ein A.t.-  
5 OK1 Protein, welches an seinem N-terminus die zusätzlichen 21 Aminosäuren, codiert durch Nucleotide, stammend aus dem Vektor aufweist. Das aus diesem Vektor resultierende rekombinante A.t.-OK1-Protein enthält daher 21, aus dem Vektor pDEST™17 stammende, zusätzliche Aminosäuren an seinem N-Terminus.

#### 10 4. Heterologe Expression des OK1 Proteins in *E. coli*

Der nach Beispiel 3 erhaltene Expressionsvektorektor A.t.-OK1-pDEST™17 wurde in den *E. coli* Stamm BL21 Star™ (DE3) (Invitrogen, Prod. Nr. C6010-03) transformiert. Eine Beschreibung dieses Expressionssystems ist bereits weiter oben (siehe Punkt 3., Allgemeine Methoden) erfolgt. Aus der Transformation resultierende Bakterienklone,  
15 enthaltend den Vektor A.t.-OK1-pDEST™17, dienten zunächst zur Herstellung einer Vorkultur, die anschließend zur Beimpfung einer Hauptkultur verwendet wurde (siehe Punkt 3.c), Allgemeine Methoden). Vorkultur und Hauptkultur wurden jeweils bei 30°C unter Schütteln (250 rpm) inkubiert. Nachdem die Hauptkultur eine OD<sub>600</sub> von ca. 0,8 erreicht hatte wurde die Expression des rekombinanten A.t.-OK1 Proteins  
20 durch Zugabe von IPTG (Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosid) bis zu einer Endkonzentration von 1 mM induziert. Nach Zugabe von IPTG wird die Hauptkultur bei 30°C unter Schütteln (250 rpm) inkubiert, bis eine OD<sub>600</sub> von ca. 1,8 erreicht war. Anschließend wurde die Hauptkultur für 30 Minuten auf Eis gekühlt, bevor die Zellen der Hauptkultur durch Zentrifugation (10 Minuten bei 4.000xg und 4°C) vom  
25 Kulturmedium abgetrennt wurden.

## 5. Reinigung des rekombinant exprimierten OK1 Proteins

Die Reinigung und Aufkonzentration des A.t.-OK1 Proteins aus Zellen, erhalten nach Beispiel 4, wurde nach dem unter Punkt 4, Allgemeine Methoden beschriebenen Verfahren durchgeführt.

5

## 6. Nachweis von Stärke phosphorylierender Aktivität des OK1 Proteins

Der Nachweis der Stärke phosphorylierenden Aktivität des A.t.-OK1 Proteins erfolgte nach dem unter Punkt 11, Allgemeine Methoden beschriebenen Verfahren. Dabei wurden jeweils 5 µg von nach Beispiel 5 hergestelltem, gereinigtem A.t.-OK1 Protein, in einem Ansatz A mit 5 mg Stärke, isoliert aus einer *sex1-3* Mutante von *Arabidopsis thaliana* nach Beispiel 1 b) und in einem Ansatz B mit 5 mg Stärke, erhalten durch enzymatische Phosphorylierung nach Beispiel 1 c) in jeweils 500 µl Phosphorylierungspuffer enthaltend 0,05 mM radioaktiv (<sup>33</sup>P) markiertes, randomisiertes ATP (insgesamt 1.130.00 cpm, ca. 0,55 µCi) für 30 Minuten bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Als Kontrolle diente ein Ansatz C, welcher dem Ansatz B entsprach, jedoch kein OK1 Protein enthielt, ansonsten aber in gleicher Weise behandelt wurde, wie die Ansätze A und B. Für alle Ansätze (A, B, C) wurden jeweils zwei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt.

Mittels Verwendung eines Scintillationszählers wurden die Stärken aus den Ansätzen A, B, und C auf das Vorliegen von radioaktiv markiertem Phosphat hin untersucht (siehe Punkt 11 b), Allgemeine Methoden). Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 und in Fig. 3 dargestellt.

20

	Gemessene Radioaktivität [cpm]	
	Versuch 1	Versuch 2
Ansatz A (nicht-phosphorylierte Stärke + OK1)	42	47
Ansatz B (phosphorylierte Stärke + OK1)	7921	8226
Ansatz C (phosphorylierte Stärke ohne Protein)	56	53

Tabelle 1: Nachweis einer Stärke phosphorylierenden Aktivität des Ok1 Proteins

Aus den erhaltenen Ergebnissen ist erkennbar, dass das OK1 Protein keine Phosphatgruppen von ATP auf Stärke überträgt, wenn nicht-phosphorylierte-Stärke  
5 als Substrat angeboten wird, da der in cpm gemessene Anteil der durch ein OK1 Protein auf nicht-phosphorylierte-Stärke übertragenen Phosphatgruppen den Anteil der radioaktiv markierten Phosphatgruppen in Ansatz C (Kontrolle) nicht übersteigt. Wird hingegen P-Stärke als Substrat angeboten, ist der in cpm gemessene Anteil an radioaktiven Phosphatgruppen, welcher von ATP auf P-Stärke übertragen wird,  
10 signifikant höher. Daraus ist ersichtlich, dass das OK1 Protein P-Stärke als Substart benötigt und dass nicht-phosphorylierte-Stärke nicht als Substart von dem OK1 Protein akzeptiert wird.

Wird der oben dargestellte Versuch mit spezifisch in gamma-Position mit <sup>33</sup>P markiertem ATP durchgeführt, so kann kein Einbau von radioaktiv markiertem  
15 Phosphat in die Stärke festgestellt werden. Daraus ergibt sich, dass der beta-Phosphatrest des ATP von einem OK1 Protein auf Stärke übertragen wird. Die Ergebnisse eines solchen Versuches sind in Fig. 6 dargestellt.

## 7. Nachweis der Autophosphorylierung

Der Nachweis der Autophosphorylierung des A.t.-OK1 Proteins erfolgte mittels der weiter oben beschriebenen Methode (siehe Punkt 12, Allgemeine Methoden). Dabei wurden 50 µg gereinigtes A.t.-OK1 Protein mit radioaktiv markiertem, randomisiertem  
5 ATP in 220 µl Phosphorylierungspuffer (siehe oben, Punkt 12 d), Allgemeine Methoden) bei Raumtemperatur für 60 Minuten unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden den Inkubationsansätzen jeweils 100 µl entnommen und in vier frische Reaktionsgefäße überführt. In Reaktionsgefäß 1 wurde die Reaktion durch Zugabe von je 40 µl 0,11M EDTA gestoppt. Reaktionsgefäß 2 wurde bei 95°C für 5  
10 Minuten inkubiert. Zu Reaktionsgefäß 3 wurde HCl bis zu einer Endkonzentration von 0,5 M zugegeben und zu Reaktionsgefäß 4 wurde NaOH bis zu einer Endkonzentration von 0,5 M zugegeben. Die Reaktionsgefäße 3 und 4 wurden jeweils für 25 Minuten bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden jeweils 50 µl der Reaktionsgefäße 1, 2, 3 und 4 entnommen, mit SDS Probenpuffer versetzt und  
15 mittels SDS-Acrylamidgelelektrophorese (7,5%iges Acrylamidgel) aufgetrennt. Dazu wurden Proben der Reaktionsgefäße auf jeweils zwei identische Acrylamidgele aufgetragen. Eines der nach erfolgter Elektrophorese erhaltenen Gele wurde einer Autoradiographie unterzogen, während das zweite Gel mit Comassie Blau gefärbt wurde.

20 In dem mit Comassie Blau gefärbten Gel (siehe Fig. 2A)) ist deutlich zu erkennen, dass die Behandlung mit 0,5 M NaOH zu einem Abbau des OK1 Proteins führt. Das OK1 Protein ist daher als labil gegenüber NaOH zu bezeichnen. Inkubation bei 30°C, 95°C und mit 0,5 M HCl zeigen, dass das OK1 Protein unter den genannten Inkubationsbedingungen relativ stabil ist. Dieses ist daraus zu schließen, dass bei  
25 diesen Inkubationsbedingungen jeweils etwa gleiche Mengen OK1 Protein nach Comassie Blau Färbung im betreffenden Gel nachgewiesen werden können.

In der Autoradiographie (siehe Abb. 2B)) ist durch Vergleich mit bei 30°C inkubiertem phosphoryliertem OK1 Protein zu erkennen, dass eine Inkubation des phosphorylierten OK1 Proteins bei 95°C zu einer deutlichen Reduzierung des  
30 Phosphates, welches an das OK1 Protein gebunden ist, führt. Die Bindung zwischen

dem Phosphatrest und einer Aminosäure des OK1 Proteins ist daher als Hitzelabil zu bezeichnen. Weiterhin ist eine leichte Abnahme des an das OK1 Protein gebundenen Phosphates ebenfalls bei Inkubation mit 0,5 M HCl und 0,5 M NaOH im Vergleich mit bei 30°C inkubiertem phosphoryliertem OK1 Protein zu beobachten.

- 5 Wird die Tatsache berücksichtigt, dass die Menge des OK1 Proteins in der Autoradiographie nach Behandlung mit 0,5 M NaOH wegen der Labilität des OK1 Proteins gegenüber NaOH wesentlich geringer ist, als in den mit Hitze und Säure behandelten Proben, so kann geschlossen werden, dass die Bindung zwischen dem Phosphatrest und einer Aminosäure des OK1 Proteins relativ stabil gegenüber
- 10 Basen ist. Da die mit Säure behandelte Probe etwa gleiche Proteinmengen wie die bei 30°C und bei 95°C inkubierte Probe enthält, jedoch ein signifikant geringeres Signal als die mit 30°C behandelte Probe in der Autoradiographie aufweist, ist davon auszugehen, dass auch saure Inkubationsbedingungen die Bindung zwischen einem Phosphatrest und einer Aminosäure des OK1 Proteins zu einem gewissen Maße
- 15 spalten. Daher konnte in den durchgeführten Versuchen auch eine Labilität der Bindung zwischen einem Phosphatrest und einer Aminosäure des OK1 Proteins festgestellt werden. Die Labilität gegenüber Säuren ist dabei jedoch wesentlich weniger ausgeprägt als die Labilität gegenüber Hitze.

Bindungen zwischen der Aminosäure Histidin und Phosphat sind Hitzelabil, Säurelabil aber Basestabil (Rosenberg, 1996, Protein Analysis and Purification, Birkhäuser, Boston, 242-244). Die oben beschriebenen Ergebnisse sind daher ein Hinweis darauf, dass durch Autophosphorylierung eines OK1 Proteins ein Phosphohistidin entsteht.

20

Wird rekombinant exprimiertes OK1 Protein wie oben beschrieben mit spezifisch in gamma-Position mit <sup>33</sup>P markiertem ATP inkubiert, so kann keine Autophosphorylierung festgestellt werden. Fig. 5 A) zeigt die Menge an Protein, die nach den betreffenden Inkubationsschritten mittels Western Blot Analyse in dem jeweiligen Reaktionsansatz noch nachgewiesen werden kann. Fig. 5 B) zeigt eine Autoradiographie von Protein aus den einzelnen Reaktionsansätzen. Es ist zu

25

30 erkennen, dass bei Verwendung von spezifisch in der gamma-Position markiertem



ATP keine Autophosphorylierung des OK1 Proteins auftritt, während bei Verwendung von randomisiertem ATP eine Autophosphorylierung nachgewiesen werden kann. Dieses bedeutet, dass bei der Autophosphorylierung eines OK1 Proteins der Phosphatrest der beta-Position des ATP kovalent an eine Aminosäure des OK1  
5 Proteins gebunden wird.

#### 8. Nachweis der von einem OK 1 Protein phosphorylierten C-Atom-Positionen der Glucosemoleküle von Stärke

##### a) Herstellung von phosphorylierter-Stärke

10 Phosphorylierte Stärke wurde nach Punkt 7, Allgemeine Methoden hergestellt. Es wurden dazu in einem Ansatz A 5 mg nicht phosphorylierte Stärke, isoliert aus Blättern einer *sex1-3* Mutante von *Arabidopsis thaliana* mit 25 µg gereinigtem A.t.-OK1 Protein und in einem zweiten Ansatz B 5 mg *in vitro* phosphorylierter-Stärke ursprünglich isoliert aus Blättern einer *sex1-3* Mutante von *Arabidopsis thaliana*) mit  
15 5 µg gereinigtem R1 Protein eingesetzt. Die Reaktion erfolgte jeweils in 500 µl Phosphorylierungspuffer, der jeweils  $^{33}\text{P}$  markiertes ATP (ca.  $2,5 \times 10^6$  cpm) enthielt, durch Inkubation bei Raumtemperatur für 1 Stunde unter Schütteln. Zusätzlich wurde ein Kontrollansatz, welcher 5 mg Stärke, isoliert aus Blättern einer *sex1-3* Mutante von *Arabidopsis thaliana* und den genannten Phosphorylierungspuffer, jedoch kein  
20 Protein enthielt, verwendet. Der Kontrollansatz wurde genauso behandelt, wie die Ansätze A und B. Die einzelnen Reaktionen wurden durch Zugabe von jeweils 125 µl 10% SDS gestoppt und mit je 900 µl einmal mit 2% SDS, fünfmal mit 2 mM ATP und zweimal mit  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen. Nach jedem Waschschrift erfolgte eine Zentrifugation (jeweils 2 Minuten in einer Eppendorf Tischzentrifuge bei 13.000 rpm). Die  
25 erhaltenen Stärkepellets wurden jeweils in 1 ml  $\text{H}_2\text{O}$  resuspendiert und 100 µl jedes Ansatzes wurden nach Zugabe von 3 ml Scintillationscocktail (Ready Safe<sup>TM</sup>, BECKMANN) versetzt und anschließend mit Hilfe eines Scintillationszählers (LS 6500 Multi-Purpose Scintillation Counter, BECKMANN COULTER<sup>TM</sup>) vermessen.

Die Messung ergab folgende Ergebnisse:

Kontrolle:	63 cpm/100 µL	630 cpm/1000 µl
Ansatz A (OK1):	1351 cpm/100 µl	13512 cpm/1000 µl
Ansatz B (R1):	3853 cpm/100 µl	38526 cpm/1000 µl

5 b) Totalhydrolyse der P-Stärke

Die nach Schritt a) erhaltenen Suspensionen der Ansätze A, B und C wurden erneut zentrifugiert (5 Minuten in einer Eppendorf Tischzentrifuge bei 13.000 rpm), die erhaltenen Pellets in 90 µl 0,7 M HCl (Baker, zur Analyse) resuspendiert und anschließend für 2 Stunde bei 95°C inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze A, B und C erneut zentrifugiert (5 Minuten in einer Eppendorf Tischzentrifuge bei 13.000 rpm), und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Sedimentierte Rückstände der Ansätze wurden in jeweils 100 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert und nach Zugabe von je 3 ml Scintillationscocktail (Ready Safe<sup>TM</sup>, BECKMANN) mit Hilfe eines Scintillationszählers (LS 6500 Multi-Purpose Scintillation Counter, BECKMANN COULTER<sup>TM</sup>) vermessen. In keinem der Rückstände konnten signifikante Mengen an Radioaktivität nachgewiesen werden, was bedeutet, dass sich alle mit radioaktivem Phosphat markierten Hydrolyseprodukte im Überstand befinden.

Danach erfolgte die Neutralisation der einzelnen Überstände, enthaltend die Hydrolyseprodukte, durch Zugabe von jeweils 30 µl 2 M NaOH (die Menge der zur Neutralisation benötigten Menge von NaOH wurde vorher an Blindproben ausgetestet): Die neutralisierten Hydrolyseprodukte wurden auf einen 10 kDa Microcon-Filter, der vorher zweimal mit je 200 µl H<sub>2</sub>O gespült wurde, gegeben und für ca. 25 Minuten bei 12.000 rpm in einer Eppendorf Tischzentrifuge zentrifugiert. Von dem erhaltenen Filtrat (jeweils ca. 120 µl) wurden je 10 µl abgenommen, die nach Zugabe von je 3 ml Scintillationscocktail (Ready Safe<sup>TM</sup>, BECKMANN) mit Hilfe eines Scintillationszählers (LS 6500 Multi-Purpose Scintillation Counter, BECKMANN COULTER<sup>TM</sup>) vermessen wurden. Die Bestimmung der in den einzelnen Ansätzen vorliegenden Aktivität ergab dabei folgende Ergebnisse:

Ansatz A (OK1):	934 cpm/10 µl	11.208 cpm/120 µl	93 cpm/µl
-----------------	---------------	-------------------	-----------

Ansatz B (R1):      2518 cpm/10 µl      30.216 cpm/120 µl      252 cpm/µl

c) Auftrennung der Hydrolyseprodukte

Die Auftrennung der nach Schritt b) erhaltenen Hydrolyseprodukte wurde mittels  
5 HPAE unter Verwendung einer Dionex Anlage unter den oben angegebenen  
Bedingungen (siehe (Allgemeine Methoden Punkt 13 c)) durchgeführt.. Die Proben  
zur Auftrennung der filtrierten Überstände der Ansätze A und B, erhalten nach Schritt  
b) waren dazu wie folgt zusammengesetzt:

Ansatz A (OK1):    43 µl des nach Schritt b) erhaltenen Überstand des Ansatzes A  
10 (entspricht ca. 4.000 cpm), 32 µl H<sub>2</sub>O, 2,5 µl 2,5 mM Glucose-6-Phosphat und 2,5 µl  
5 mM Glucose-3-Phosphat (Σ Volumen = 80 µl).

Ansatz B (R1):    16 µl des nach Schritt b) erhaltenen Überstand des Ansatzes B  
(entspricht ca. 4.000 cpm), 59 µl H<sub>2</sub>O, 2,5 µl 2,5 mM Glucose-6-Phosphat und 2,5 µl  
5 mM Glucose-3-Phosphat (Σ Volumen = 80 µl).

15 Jeweils 60 µl, enthaltend ca. 3.000 cpm, der entsprechenden Proben wurden zur  
Auftrennung mittels HPAE injiziert. Die Durchführung der HPAE erfolgte nach den  
unter Punkt 23 c) angegebenen Bedingungen. Die Elutionspuffer wurden nach  
Passage der HPAE-Säule in Fraktionen von je 1 ml aufgesammelt. Das Aufsammeln  
der Fraktionen wurde 10 Minuten nach Injektion der Probe begonnen. Anhand des  
20 erhaltenen Signals des eingesetzten PAD Detektors konnte die Elution von Glucose-  
6-Phosphat der Fraktion 15 und die die Elution von Glucose-3-Phosphat der Fraktion  
17 zugeordnet werden. Jeweils 500 µl der einzelnen Fraktionen wurden mit je 3 ml  
Scintillationscocktail (Ready Safe™, BECKMANN) gemischt und anschließend mit  
Hilfe eines Scintillationszählers (LS 6500 Multi-Purpose Scintillation Counter,  
25 BECKMANN COULTERTM) vermessen. Für die einzelnen Fraktionen wurden  
folgende Meßwerte erhalten:

	Gesamt cpm je Fraktion		
	Ansatz (OK1)	AAnsatz (R1)	B
Fr 13	8,7	3,3	
Fr 14	13,1	32,2	
Fr 15 (G6P)	207,3	1952,8	
Fr 16	399,8	112,3	
Fr 17 (G3P)	1749,2	801,6	
Fr 18	196,7	17,3	
Fr 19	6,7	18,9	
Summe	2581,5	2938,3	
Auftrag	3000,0	3000,0	
Wiederfindung	86,0%	97,9%	

**Tabelle 4:** Gemessene Menge an Radiaktivität [cpm] in einzelnen Fraktionen von Hydrolyseprodukten, erhalten durch Hydrolyse von mittels eines OK1 Proteins oder R1 Proteins phosphorylierten Stärke.

Die Ergebnisse sind auch in Fig. 5 graphisch dargestellt

5

Nach von R1 Protein katalysierter Phosphorylierung von Stärke eluierten nach Hydrolyse der Stärke ca. 66% des radioaktiv markierten Phosphates, bezogen auf das gesamte gemessene radioaktive Phosphat in den analysierten Fraktionen, mit der Fraktion, die Glucose-6-Phosphat als Standard enthielt und ca. 27% mit der

10 Fraktion, die Glucose-3-Phosphat als Standard enthielt. Nach von OK1 Protein katalysierter Phosphorylierung von Stärke, eluierten nach Hydrolyse der Stärke ca. 67% des radioaktiv markierten Phosphates, bezogen auf das gesamte gemessene radioaktive Phosphat in den analysierten Fraktionen, mit der Fraktion, die Glucose-3-Phosphat als Standard enthielt und ca. 8% mit der Fraktion, die Glucose-6-Phosphat

15 als Standard enthielt.. Daraus kann geschlossen werden, dass Glucosemoleküle der

Stärke von R1 Proteinen bevorzugt in C-6-Position phosphoryliert werden, während von OK1 Proteinen Glucosemoleküle der Stärke bevorzugt in C-3-Position phosphoryliert werden.

## 5 9. Identifizierung eines OK1 Proteins in Reis

Durch Verwendung der unter den Punkten 1 bis 13, Allgemeine Methoden beschriebenen Verfahren konnte auch ein Protein aus *Oryza sativa* (Varietät M202) identifiziert werden, welches einen Phosphatrest von ATP auf P-Stärke überträgt. Das Protein wurde mit O.s.-OK1 bezeichnet. Nicht-phosphorylierte-Stärke wird von dem O.s.-OK1 Protein nicht als Substrat verwendet, d.h. auch das O.s.-OK1 Protein benötigt P-Stärke als Substrat. Die das identifizierte O.s.-OK1 Protein codierende Nucleinsäuresequenz ist unter SEQ ID NO 3 und die das O.s.-OK1 Protein codierende Aminosäuresequenz ist unter SEQ ID NO. 4 dargestellt. Die unter SEQ ID NO 4 dargestellte Aminosäuresequenz codierend das O.s.-OK1 Protein weist eine Identität von 57% mit der unter SEQ ID NO 2 dargestellten Aminosäuresequenz codierend das A.t.-OK1 Protein auf. Die unter SEQ ID NO 3 dargestellte Nucleinsäuresequenz codierend das O.s.-OK1 Protein weist eine Identität von 61% mit der unter SEQ ID NO 1 dargestellten Nucleinsäuresequenz, codierend das A.t.-OK1 Protein auf.

20

Herstellung des Plasmides pMI50 enthaltend die Nucleinsäuresequenz codierend ein OK1 Protein aus *Oryza sativa*

Der Vektor pMI50 enthält ein DNA-Fragment welches das vollständige OK1 Protein aus Reis der Varietät M202 kodiert.

25 Die Amplifikation der DNA aus Reis erfolgte in fünf Teilschritten.

Der Teil des offenen Leserasters von Position -11 bis Position 288 der unter SEQ ID NO 3 angegebenen Sequenz wurde mit Hilfe von Reverser Transkriptase und der Polymerase Kettenreaktion unter Verwendung der synthetischen Oligonukleotide



Os\_ok1-R9 (GGAACCGATAATGCCTACATGCTC) und Os\_ok1-F6  
(AAAACTCGAGGAGGATCAATGACGTCGCTGCGGCCCTC) als Primer auf RNA von  
unreifen Reissamen amplifiziert. Das amplifizierte DNA-Fragment wurde in den  
Vektor pCR2.1 (Invitrogen Katalognummer K2020-20) kloniert. Das erhaltene  
5 Plasmid wurde mit pML123 bezeichnet.

Der Teil des offenen Leserasters von Position 250 bis Position 949 der unter SEQ  
DIE NO 3 angegebenen Sequenz wurde mit Hilfe von Reverser Transkriptase und der  
Polymerase Kettenreaktion unter Verwendung der synthetischen Oligonukleotide  
Os\_ok1-F4 (CCAGGTTAAGTTTGGTGAGCA) und Os\_ok1-R6  
10 (CAAAGCACGATATCTGACCTGT) als Primer auf RNA von unreifen Reissamen  
amplifiziert. Das amplifizierte DNA-Fragment wurde in den Vektor pCR2.1 (Invitrogen  
Katalognummer K2020-20) kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit pML120  
bezeichnet.

Der Teil des offenen Leserasters von Position 839 bis Position 1761 der unter SEQ  
15 DIE NO 3 angegebenen Sequenz wurde mit Hilfe von Reverser Transkriptase und der  
Polymerase Kettenreaktion unter Verwendung der synthetischen Oligonukleotide  
Os\_ok1-F7 (TTGTTCGCGGGATATTGTCAGA) und Os\_ok1-R7  
(GACAAGGGCATCAAGAGTAGTATC) als Primer auf RNA von unreifen Reissamen  
amplifiziert. Das amplifizierte DNA-Fragment wurde in den Vektor pCR2.1 (Invitrogen  
20 Katalognummer K2020-20) kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit pML121  
bezeichnet.

Der Teil des offenen Leserasters von Position 1571 bis Position 3241 der unter SEQ  
DIE NO 3 angegebenen Sequenz wurde mit Hilfe von Reverser Transkriptase und der  
Polymerase Kettenreaktion unter Verwendung der synthetischen Oligonukleotide  
25 Os\_ok1-F8 (ATGATGCGCCTGATAATGCT) und Os\_ok1-R4  
(GGCAAACAGTATGAAGCACGA) als Primer auf RNA von unreifen Reissamen  
amplifiziert. Das amplifizierte DNA-Fragment wurde in den Vektor pCR2.1 (Invitrogen  
Katalognummer K2020-20) kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit  
pML119 bezeichnet.

Der Teil des offenen Leserasters von Position 2777 bis Position 3621 wurde mit Hilfe der Polymerase Kettenreaktion unter Verwendung der synthetischen Oligonukleotide Os\_ok1-F3 (CATTTGGATCAATGGAGGATG) und Os\_ok1-R2 (CTATGGCTGTGGCCTGCTTTGCA) als Primer auf genomischer DNA von Reis  
5 amplifiziert. Das amplifizierte DNA-Fragment wurde in den Vektor pCR2.1 (Invitrogen Katalognummer K2020-20) kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit pML122 bezeichnet.

Die Zusammenklonierung der Teilstücke des offenen Leserasters von OK1 erfolgte folgendermaßen:

- 10 Ein 700 Basenpaare langes *Apal*-Fragment aus pML120, einen Teil des offenen Leserasters von OK1 enthaltend wurde in die *Apal*-Schnittstelle von pML121 kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit pMI47 bezeichnet.

- 15 Ein 960 Basenpaare langes Fragment enthaltend die für OK1 codierenden Bereiche der Vektoren aus pML120 und pML123 wurde mittels Polymerase Kettenreaktion amplifiziert. Dabei wurden die Primer Os\_ok1-F4 (s. o.) und Os\_ok1-R9 (s. o.) je in einer Konzentration von 50 nm und die Primer Os\_ok1-F6 und Os\_ok1-R6 je in einer Konzentration von 500 nm eingesetzt. Das amplifizierte DNA-Fragment wurde in den Vektor pCR2.1 (Invitrogen Katalognummer K2020-20) kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit pMI44 bezeichnet.

- 20 Ein 845 Basenpaare langes Fragment aus pML122 wurde zur Einführung einer *XhoI*-Schnittstelle nach dem Stop-Codon mit den Primern Os\_ok1-F3 (s. o.) und Os\_ok1-R2Xho (AAACTCGAGCTATGGCTGTGGCCTGCTTTGCA) reamplifiziert und in den Vektor pCR2.1 (Invitrogen Katalognummer K2020-20) kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit t pMI45 bezeichnet.

- 25 Ein 1671 Basenpaare langes Fragment enthaltend einen Teil des offenen Leserasters von OK1 wurde aus pML119 durch Verdau mit den Restriktionsenzymen *SpeI* und *PstI* erhalten. Das Fragment wurde in pBluskript II SK+ (Genbank Acc: X52328) kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit pMI46 bezeichnet.

Ein 1706 Basenpaare langes Fragment enthaltend einen Teil des offenen Leserasters von OK1 wurde mit den Restriktionsenzymen *SpeI* und *XhoI* aus pMI46 herausgeschnitten und in den Vektor pMI45 kloniert, der mit denselben Restriktionsenzymen geschnitten worden war. Das erhaltene Plasmid wurde mit  
5 pMI47 bezeichnet.

Ein 146 Basenpaare langes Fragment enthaltend einen Teil des offenen Leserasters von OK1 wurde mit den Restriktionsenzymen *AflII*/*NotI* aus pMI43 herausgeschnitten und in den Vektor pMI44 kloniert, der mit denselben Restriktionsenzymen geschnitten worden war. Das erhaltene Plasmid wurde mit pMI49 bezeichnet.

10 Ein 1657 Basenpaare langes Fragment enthaltend einen Teil des offenen Leserasters von OK1 wurde mit den Restriktionsenzymen *NotI* und *NarI* aus dem Vektor pMI49 herausgeschnitten und in den Vektor pMI47 kloniert, der mit denselben Restriktionsenzymen geschnitten worden war. Das erhaltene Plasmid wurde mit pMI50 bezeichnet und enthält die gesamte codierende Region des in Reis  
15 identifizierten OK1 Proteins.

#### **10. Identifizierung weiterer OK1 Proteine aus verschiedenen Pflanzenspezies**

Mit Hilfe der unter den Punkten 1 bis 13, Allgemeine Methoden beschriebenen Verfahren konnten auch Proteine in Gerste (*Hordeum vulgare*), Kartoffel (*Solanum  
20 tuberosum*), Weizen (*Triticum aestivum*) und Hirse (*Sorghum bicolor*) identifiziert werden, welche einen Phosphatrest von ATP auf P-Stärke übertragen. Nicht-phosphorylierte-Stärke wird von diesen Proteinen nicht als Substrat verwendet, d.h. diese Proteine benötigen P-Stärke als Substrat.

Die Proteine wurden nach dem unter Punkt 14, Allgemeine Methoden beschriebenen  
25 Verfahren isoliert, mit Trypsin verdaut, aus dem Gel herausgelöst und mittels Q-TOF-MS-MS sequenziert. Mit den erhaltenen Peptidsequenzen konnten durch Datenbankvergleiche (blast searches) EST Nucleinsäuresequenzen ermittelt werden,

die die betreffenden OK1 Proteine aus Gerste, Kartoffel, Weizen bzw. Hirse codieren.

Die in SEQ ID NO 9 dargestellte Nucleinsäuresequenz codiert einen Teil eines OK1 Proteins aus Gerste und wurde unter der „Accession“ Nr.: TC117610 in der TIGR  
5 (<http://tigrblast.tigr.org/tgi/>) Datenbank mittels Datenbankvergleich (blast search ) aufgespürt. In SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 7 und SEQ ID NO 8 sind diejenigen Peptide angegeben, welche durch Sequenzierung des aus Gerste isolierten OK1 Proteins mittels Q-TOF-MS-MS erhalten wurden und zur Identifizierung der unter SEQ ID NO 9 dargestellten EST Nucleinsäuresequenz dienten. Die in SEQ ID NO 10  
10 dargestellte Aminosäuresequenz codiert einen Teil eines OK1 Protein aus Gerste und kann von der in SEQ ID NO 10 dargestellten Nucleinsäuresequenz abgeleitet werden.

Die in SEQ ID NO 15 dargestellte Nucleinsäuresequenz codiert einen Teil eines OK1 Proteins aus Kartoffel und wurde unter der „Accession“ Nr.: BF054632 in der TIGR  
15 (<http://tigrblast.tigr.org/tgi/>) Datenbank mittels Datenbankvergleich (blast search ) aufgespürt. In SEQ ID NO 11, SEQ ID NO 12, SEQ ID NO 13 und SEQ ID NO 14 sind diejenigen Peptide angegeben, welche durch Sequenzierung des aus Kartoffel isolierten OK1 Proteins mittels Q-TOF-MS-MS erhalten wurden und zur Identifizierung der unter SEQ ID NO 15 dargestellten EST Nucleinsäuresequenz  
20 dienten. Die in SEQ ID NO 16 dargestellte Aminosäuresequenz codiert einen Teil eines OK1 Protein aus Kartoffel und kann von der in SEQ ID NO 15 dargestellten Nucleinsäuresequenz abgeleitet werden.

Die in SEQ ID NO 21 dargestellte Nucleinsäuresequenz codiert einen Teil eines OK1 Proteins aus Hirse und wurde unter der „Accession“ Nr.: TC77219 in der TIGR  
25 (<http://tigrblast.tigr.org/tgi/>) Datenbank mittels Datenbankvergleich (blast search ) aufgespürt. In SEQ ID NO 17, SEQ ID NO 18, SEQ ID NO 19 und SEQ ID NO 20 sind diejenigen Peptide angegeben, welche durch Sequenzierung des aus Hirse isolierten OK1 Proteins mittels Q-TOF-MS-MS erhalten wurden und zur Identifizierung der unter SEQ ID NO 21 dargestellten EST Nucleinsäuresequenz  
30 dienten. Die in SEQ ID NO 22 dargestellte Aminosäuresequenz codiert einen Teil

eines OK1 Protein aus Hirse und kann von der in SEQ ID NO 21 dargestellten Nucleinsäuresequenz abgeleitet werden.

Die in SEQ ID NO 25 dargestellte Nucleinsäuresequenz codiert einen Teil eines OK1 Proteins aus Weizen und wurde unter der „Accession“ Nr.: CA741319 in der TIGR  
5 (<http://tigrblast.tigr.org/tgi/>) Datenbank mittels Datenbankvergleich (blast search ) aufgespürt. In SEQ ID NO 23 und SEQ ID NO 24 sind diejenigen Peptide angegeben, welche durch Sequenzierung des aus Weizen isolierten OK1 Proteins mittels Q-TOF-MS-MS erhalten wurden und zur Identifizierung der unter SEQ ID NO 25 dargestellten EST Nucleinsäuresequenz dienten. Die in SEQ ID NO 26  
10 dargestellte Aminosäuresequenz codiert einen Teil eines OK1 Protein aus Weizen und kann von der in SEQ ID NO 25 dargestellten Nucleinsäuresequenz abgeleitet werden.

Um die Datenbankvergleiche durchzuführen wurden folgende Einstellungen gewählt:

Program: tblastn  
15 Matrix: blosum62  
Expect: 100  
Echofilter: disabled  
Descriptions: 20

Alle anderen Einstellungen lauteten „default“.

20

#### **11. Herstellung eines Antikörpers, der ein OK1 Protein spezifisch erkennt**

Als Antigen wurde ca. 100 µg gereinigtes A.t.-OK1 Protein mittels SDS Gelelektrophorese aufgetrennt, die Proteinbande enthaltend das A.t.-OK1 Protein ausgeschnitten und an die Firma EUROGENTEC S.A. (Belgien) verschickt, die die  
25 Herstellung des Antikörpers im Auftrag ausführte. Zunächst wurden die Preimmunseren von Kaninchen dahingehend geprüft, ob sie evtl. bereits vor der Immunisierung mit rekombinantem OK1 ein Protein aus einem A. t. Gesamtextrakt



erkennen. Die Preimmunseren zweier Kaninchen erkannten im Bereich 100-150 kDa keine Proteine und wurden daraufhin für die Immunisierung ausgewählt. Pro Kaninchen wurden 4 Injektionen à 100 µg Protein durchgeführt (Tag 0, 14, 28, 56). Je Kaninchen wurden 4 Blutentnahmen durchgeführt: (Tag 38, Tag 66, Tag 87 und 5 die Endblutung). Serum, erhalten nach der ersten Blutung zeigte bereits eine spezifische Reaktion mit OK1 Antigen im Western-Blot. Für alle weiteren Versuche wurde jedoch die letzte Blutung eines Kaninchens verwendet.

## 12. Herstellung transgener Reispflanzen, die eine erhöhte oder eine verringerte Aktivität eines OK1 Proteins aufweisen

### 10 a) Herstellung des Plasmides pGlo-A.t.-OK1

Das Plasmid pIR94 wurde erhalten indem der Promoter des Globulin-Gens aus Reis durch eine Polymerase Kettenreaktion (30 x 20 sec 94 °C, 20 sec 62 °C, 1 min 68 °C, 4 mM Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) mit den Primern glb1-F2 (AAAACAATTGGCGCCTGGAGGGAGGAGA) und glb1-R1 (AAAACAATTGATGATCAATCAGACAATCACTAGAA) auf genomischer DNA von 15 Reis der Varietät M202 mit High Fidelity Taq Polymerase (Invitrogen, Katalognummer 11304-011) amplifiziert und in pCR2.1 (Invitrogen Katalognummer K2020-20) kloniert wurde.

Das Plasmid pIR115 wurde erhalten indem eine synthetisches Stück DNA bestehend 20 aus den beiden Oligonukleotiden X1 (TGCAGGCTGCAGAGCTCCTAGGCTCGAGTTAACACTAGTAAGCTTAATTAAGAT ATCATTTAC) und X2 (AATTGTAAATGATATCTTAATTAAGCTTACTAGTGTTAACTCGAGCCTAGGAGCT CTGCAGCCTGCA) in den mit *SdaI* und *MunI* geschnittenen Vektor pGSV71 kloniert 25 wurde.

Das erhaltene Plasmid pIR115 wurde mit *SdaI* geschnitten, die überstehenden 3'-Enden mit T4 DNA Polymerase geglättet und ein 197 Basenpaare großes, mittels T4 DNA-Polymerase geglättetes *HindIII* / *SphI* Fragment aus pBinAR (Höfgen und Willmitzer, 1990, Plant Science 66, 221-230), enthaltend das Terminationssignal des

Octopinsynthese Gens aus *Agrobacterium tumefaciens*, eingefügt. Das erhaltene Plasmid wurde mit pIR96 bezeichnet.

Das Plasmid pIR103 wurde erhalten, indem ein 986 Basenpaare langes DNA Fragment aus pIR94, enthaltend den Promoter des Globulin Gens aus Reis, kloniert  
5 in das Plasmid pIR96 kloniert wurde.

pGSV71 ist ein Derivat des Plasmides pGSV7, welches sich vom intermediären Vektor pGSV1 ableitet. pGSV1 stellt ein Derivat von pGSC1700 dar, dessen Konstruktion von Cornelissen und Vanderwiele (Nucleic Acid Research 17, (1989), 19-25) beschrieben wurde. pGSV1 wurde aus pGSC1700 erhalten, durch Deletion  
10 des Carbenicillin Resistenzgens, sowie Deletion der T-DNA-Sequenzen der TL-DNA-Region des Plasmides pTiB6S3.

pGSV7 enthält den Replikationsursprung des Plasmides pBR322 (Bolivar et al., Gene 2, (1977), 95-113) sowie den Replikationsursprung des *Pseudomonas*-Plasmides pVS1 (Itoh et al., Plasmid 11, (1984), 206). pGSV7 enthält außerdem das  
15 selektierbare Markergen *aadA*, aus dem Transposon Tn1331 aus *Klebsiella pneumoniae*, welches Resistenz gegenüber den Antibiotika Spectinomycin und Streptomycin verleiht (Tolmasky, Plasmid 24 (3), (1990), 218-226; Tolmasky and Crosa, Plasmid 29(1), (1993), 31-40)

Das Plasmid pGSV71 wurde erhalten durch Klonierung eines chimären *bar*-Gens  
20 zwischen die Borderregionen von pGSV7. Das chimäre *bar*-Gen enthält die Promotorsequenz des Blumenkohlmosaikvirus zur Initiation der Transkription (Odell et al., Nature 313, (1985), 180), das *bar*-Gen aus *Streptomyces hygroscopicus* (Thompson et al., Embo J. 6, (1987), 2519-2523) und den 3'-untranslatierten Bereich des Nopalinsynthasegens der T-DNA von pTiT37, zur Termination der Transkription  
25 und Polyadenylierung. Das *bar*-Gen vermittelt Toleranz gegenüber dem Herbizid Glufosinat-Ammonium.

Ein DNA-Fragment, welches die Sequenz des vollständigen offenen Leserasters des OK1 Proteins aus *Arabidopsis* enthält, wurde aus dem Vektor A.t.-ok1-pGEM-T herausgeschnitten und in den Vektor pIR103 kloniert. Dazu wurde das Plasmid A.t.-

ok1-pGEM-T mit dem Restriktionsenzymen *Bsp120I* geschnitten, mit T4-DNA-Polymerase die Enden geglättet und mit *Sall* nachgeschnitten. Das DNA-Fragment kodierend das OK1 Protein aus *Arabidopsis thaliana* wurde in den mit *Ecl136II* und *XhoI* geschnittenen Vektor pIR103 kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit pGlo-A.t.-  
5 OK1 bezeichnet.

b) Herstellung eines Konstruktes zur Inhibierung des OK1 Proteins in Reis mittels RNAi Technologie

Das Plasmid pML125, welches zur Transformation von Reispflanzen verwendet  
10 wurde, wurde durch spezifische Rekombination der Plasmide pML124 und pIR115 unter Verwendung des Gateway<sup>TM</sup> Klonierungssystems (Invitrogen) erhalten.

pML124 wurde erhalten, indem ein 359 Basenpaare langes DNA-Fragment aus pML119 (siehe oben, Beispiel 9), enthaltend einen Teil des offenen Leserasters welcher für das ok1-Protein aus Reis codiert, in den mit *EcoRI* geschnittenen Vektor  
15 pENTR-1A (Invitrogen, Produktnummer 11813-011) kloniert wurde.

Das Plasmid pIR87 wurde erhalten indem das Intron 1 des Gens codierend für Alkoholdehydrogenase aus Mais mit den Primern Adh(i)-1  
(TTTCTCTCGAGGTCCGCCTTGTTTCTCCT) und Adh(i)-2  
(TTTCTCTCGAGCTGCACGGGTCCAGGA) auf genomischer DNA von Mais amplifiziert  
20 wurde. Das Produkt der Polymerase Kettenreaktion (30 x 30 sec 94 °C, 30 sec 59 °C, 1 min 72 °C, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>) wurde mit dem Restriktionsenzym *XhoI* verdaut und in den Vektor pBluescript II SK+ (Genbank Acc.: X52328) kloniert, der mit dem gleichen Enzym geschnitten worden war.

In den Vektor pIR96 wurde ein 986 Basenpaare langes DNA Fragment aus pIR94,  
25 enthaltend den Promoter des Globulin-Gens aus Reis, kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit pIR103 bezeichnet.

Das Plasmid pIR107 wurde erhalten indem die „RfA-Kassette“ (s. o.) in das mit dem Restriktionsenzym *EcoRV* geschnittene Plasmid pIR103 kloniert wurde.

Aus dem Plasmid pIR87 wurde mit dem Restriktionsenzym *XhoI* ein 540 Basenpaare langes Fragment enthaltend das Intron 1 des Gens codierend für Alkoholdehydrogenase aus Mais herausgeschnitten und in den ebenfalls mit *XhoI* geschnittene Plasmid pIR107 kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit pIR114  
5 bezeichnet. Das Plasmid pIR115 wurde erhalten indem die „RfA-Kassette“ (s. o.) in das mit *Eco*136II geschnittene Plasmid pIR114 kloniert wurde.

c) Transformation von Reispflanzen

Reispflanzen (Varietät M202) wurden mittels *Agrobacterium* (enthaltend entweder  
10 das Plasmid pGlo-A.t.-OK1 oder das Plasmid pML125) unter Verwendung der bei Hiei et al. (1994, Plant Journal 6(2), 271-282) beschriebenen Methode transformiert.

d) Analyse der transgenen Reispflanzen, die das A.t.-OK1 Protein exprimierten und der von diesen Pflanzen synthetisierten Stärke

15 Es konnten mittels Northern Blot Analyse mit dem Plasmid pGlo-A.t.-OK1 transformierte Pflanzen identifiziert werden, die eine Expression des heterologen A.t.-OK1 Proteins aufwiesen.

Pflanzen, die im Vergleich zu entsprechenden Wildtyp-Pflanzen eine nachweisbare Menge an A.t.-OK1 Protein codierender mRNA aufwiesen, wurden im Gewächshaus  
20 angezogen. Körner dieser Pflanzen wurden geerntet. Stärke, aus diesen, Körnern, zeigte einen erhöhten Gehalt an kovalent an die betreffende Stärke gebundenem Phosphaat.

e) Analyse der transgenen Reispflanzen, bei welchen die Expression des  
25 endogenen OK1 Proteins mittels RNAi Technologie reprimiert wurde und der von diesen Pflanzen synthetisierten Stärke

Mittels Northern Blot Analyse konnten Reispflanzen identifiziert werden, die mit dem Plasmid pML125 transformiert waren und eine verringerte Expression der endogenen mRNA, codierend das OK1 Protein aufwiesen.

5 **13. Herstellung transgener Kartoffelpflanzen, die eine erhöhte oder eine verringerte Aktivität eines OK1 Proteins aufweisen**

a) Herstellung des Plasmides pBinB33-Hyg

Ausgehend vom Plasmid pBinB33 wurde das *EcoRI-HindIII*-Fragment umfassend den B33-Promotor, einen Teil des Polylinkers sowie den *ocs*-Terminator  
10 herausgeschnitten und in den entsprechend geschnittenen Vektor pBIB-Hyg ligiert (Becker, 1990, Nucl. Acids Res. 18, 203).

Das Plasmid pBinB33 wurde erhalten, indem der Promotor des Patatin Gens B33 aus *Solanum tuberosum* (Rocha-Sosa et al., 1989) als *DraI*-Fragment (Nukleotide - 1512 - +14) in den mit *SstI* geschnittenen Vektor pUC19, dessen Enden mit Hilfe der  
15 T4 DNA-Polymerase geglättet worden waren, ligiert wurde. Daraus entstand das Plasmid pUC19-B33. Aus diesem Plasmid wurde der B33-Promotor mit *EcoRI* und *SmaI* herausgeschnitten und in den entsprechend geschnittenen Vektor pBinAR (Höfgen und Willmitzer, 1990, Plant Science 66, 221-230) ligiert. Hieraus entstand der pflanzliche Expressionsvektor pBinB33.

20

b) Herstellung des Vektors A.t.-OK1-pBinB33-Hyg

Die codierende Sequenz des A.t.-OK1 Proteins wurde mit den Restriktionsendonucleasen *Bsp120I* und *Sall* aus dem Plasmid OK1-pGEM-T  
25 herausgeschnitten und in den mit *SmaI* und *Sall* geschnittenen Vektor pBinB33-Hyg ligiert. Das erhaltene Plasmid wurde mit A.t.-OK1-pBinB33-Hyg bezeichnet.

c) Transformation von Kartoffelpflanzen



*Agrobacterium tumefaciens* (Stamm GV2260) wurde mit dem Plasmid A.t.-OK1-pBinB33-Hyg transformiert. Anschließend wurden Kartoffelpflanzen der Varietät Désirée mit Hilfe von Agrobakterien, enthaltend das Plasmid A.t.-OK1-pBinB33-Hyg nach der bei Rocha-Sosa et al. (EMBO J. 8, (1989), 23-29) beschriebenen Methode  
5 transformiert und Pflanzen regeneriert.

d) Analyse der transgenen Kartoffelpflanzen und der von diesen synthetisierten Stärke

Es konnten mittels Western Blot Analyse sowohl Pflanzen identifiziert werden, die  
10 eine erhöhte Aktivität des heterolog exprimierten A.t.-OK1 Proteins aufwiesen, als auch Pflanzen, bei welchen durch einen Cosuppressionseffekt die Aktivität des endogenen OK1 Proteins verringert war. Die Western Blot Analyse wurde mit dem unter Beispiel 11 beschriebenen Antikörper durchgeführt.

Pflanzen, die im Vergleich zu entsprechenden Wildtyp-Pflanzen eine erhöhte Menge  
15 an A.t.-OK1 Protein aufwiesen, wurden im Gewächshaus angezogen. Stärke, die aus Knollen dieser Pflanzen isoliert wurde, zeigte einen erhöhten Gehalt an kovalent an die Stärke gebundenem Phosphat im Vergleich zu Stärke, isoliert aus nicht transformierten Wildtyp-Pflanzen

## Patentansprüche

1. Verfahren zur Identifizierung eines Proteins, welches eine erhöhte Bindungsaktivität gegenüber phosphorylierten alpha-1,4-Glucanen, im Vergleich zu nicht phosphorylierten alpha-1,4-Glucanen aufweist, worin
  - a) Proteinextrakte in voneinander getrennten Ansätzen mit
    - i phosphorylierten alpha-1,4-Glucanen und
    - ii nicht phosphorylierten alpha-1,4-Glucaneninkubiert werden,
  - b) spezifisch an die
    - i alpha-1,4-Glucane aus Schritt a) i gebundene Proteine und
    - ii nicht phosphorylierten alpha-1,4-Glucane aus Schritt a) ii gebundene Proteinein getrennten Ansätzen voneinander in Lösung gebracht werden und
  - c) Proteine identifiziert werden, die eine erhöhte Bindungsaktivität gegenüber phosphorylierten alpha-1,4-Glucanen, verwendet in Schritt c) i, im Vergleich zu nicht phosphorylierten alpha-1,4-Glucanen, verwendet in Schritt c) ii, aufweisen.
  
2. Verfahren zur Identifizierung eines Proteins, dass eine alpha-1,4-Glucan phosphorylierende enzymatische Aktivität aufweist und phosphorylierte alpha-1,4-Glucane als Substrat benötigt, worin
  - a) Proteinextrakte mit phosphorylierten-alpha-1,4-Glucanen inkubiert werden,
  - b) spezifisch an die phosphorylierten-alpha-1,4-Glucane aus Schritt a) gebundene Proteine in Lösung gebracht werden,
  - c) Proteine erhalten nach Schritt b) jeweils mit
    - i ATP und phosphorylierten alpha-1,4-Glucanen und
    - ii ATP und nicht-phosphorylierten-alpha-1,4-Glucanenin voneinander getrennten Ansätzen inkubiert werden,
  - d) das nach Inkubation in Schritt c) i bzw. c) ii erhaltene jeweilige alpha-1,4-Glucan auf Einführung weiterer Phosphatgruppen hin untersucht wird und

- e) Proteine, identifiziert werden, die im Inkubationsanstaz nach c) i signifikante Mengen an Phosphatgruppen in alpha-1,4-Glucane eingeführt haben und im Inkubationsanstaz nach c) ii keine signifikanten Mengen an Phosphatgruppen in alpha-1,4-Glucane eingeführt haben.
- 3. Verfahren nach Anspruch 2, worin das Protein mit alpha-1,4-Glucan phosphorylierender, enzymatischer Aktivität phosphorylierte-Stärke als Substrat verwendet.
- 4. Verfahren nach Anspruch 3, worin das Protein mit Stärke phosphorylierender, enzymatischer Aktivität aus einer Pflanze stammt.
- 5. Protein erhältlich nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4.
- 6. Verfahren zur Identifizierung eines Nucleinsäuremoleküls, codierend ein Protein, welches eine alpha-1,4-Glucan phosphorylierende enzymatische Aktivität aufweist, worin
  - a) ein Protein nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4 identifiziert wird,
  - b) Aminosäuresequenzen, codierend das nach Schritt a) identifizierte Protein ermittelt werden und
  - c) Nucleinsäuremoleküle mit Hilfe der nach Schritt b) ermittelten Aminosäuren identifiziert werden.
- 7. Verfahren nach Anspruch 6, worin zur Identifizierung besagter Nucleinsäuremoleküle nach Schritt c) Nucleinsäureoligonucleotide basierend auf der Aminosäuresequenz ermittelt nach Schritt b) hergestellt werden.
- 8. Verfahren zur Identifizierung eines Nucleinsäuremoleküls, codierend ein Protein, welches alpha-1,4-Glucan phosphorylierende enzymatische Aktivität aufweist, worin
  - a) ein Protein nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4 identifiziert wird,
  - b) Antikörper, die spezifisch mit dem nach Schritt a) ermittelten Protein reagieren, hergestellt werden und

- c) Nucleinsäuremoleküle mit Hilfe der nach Schritt b) hergestellten Antikörper identifiziert werden.
9. Nucleinsäuremolekül erhältlich nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 6, 7 oder 8.
  10. Genetisch modifizierte Pflanzenzelle, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine erhöhte enzymatische Aktivität eines Proteins nach Anspruch 5 oder erhältlich nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4 im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen aufweist.
  11. Genetisch modifizierte Pflanzenzelle nach Anspruch 10, die eine Mais, Reis, Weizen, Roggen, Hafer, Gerste, Maniok, Kartoffel, Süßkartoffel, Sago, Mungbohne, Banane, Erbse, Arabidopsis, Curcuma oder Sorghum Pflanze ist.
  12. Genetisch modifizierte Pflanzenzelle, dadurch gekennzeichnet dass die genetische Modifikation in der Einführung mindestens eines fremden Nucleinsäuremoleküls nach Anspruch 9, oder erhältlich nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 6, 7 oder 8 in das Genom der Pflanze besteht.
  13. Genetisch modifizierte Pflanzenzelle, nach Anspruch 12, die eine modifizierte Stärke synthetisiert im Vergleich zu Stärke aus entsprechenden Wildtyp-Pflanzenzellen.
  14. Genetisch modifizierte Pflanzenzelle nach Anspruch 13 die eine modifizierte Stärke synthetisiert, die einen erhöhten Gehalt an Stärkephosphat und/oder eine veränderte Phosphatverteilung aufweist im Vergleich zu Stärke aus entsprechenden Wildtyp-Pflanzenzellen.
  15. Pflanzenzelle nach Anspruch 14, wobei die modifizierte Stärke dadurch gekennzeichnet ist, dass sie einen erhöhten Gehalt an kovalent an die Stärke gebundenem Phosphat in C-3-Position der Glucosemoleküle aufweist im Vergleich zu Stärke aus entsprechenden Wildtyp-Pflanzenzellen.
  16. Pflanze enthaltend genetisch modifizierte Pflanzenzellen nach einem der Ansprüche 10 bis 15.

17. Pflanze nach Anspruch 16, die eine Mais, Reis, Weizen, Roggen, Hafer, Gerste, Maniok, Kartoffel, Sago, Mungbohne, Erbse oder Sorghum Pflanze ist.
18. Pflanze nach Anspruch 17, die eine Mais- oder Weizenpflanze ist.



# SEQUENCE LISTING

<110> Bayer CropScience GmbH

<120> Verfahren zur Identifizierung von Proteinen mit Stärke phosphorylierender enzymatischer Aktivität

<130> BCS 04-5001-EP

<160> 26

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 3591

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(3591)

<223>

<400> 1

atg gag agc att ggc agc cat tgt tgc agc tct cct ttc acc ttc atc	48
Met Glu Ser Ile Gly Ser His Cys Cys Ser Ser Pro Phe Thr Phe Ile	
1 5 10 15	

act aga aac tca tca tca tca ctt cct aga ctc gtt aac atc act cac	96
Thr Arg Asn Ser Ser Ser Ser Leu Pro Arg Leu Val Asn Ile Thr His	
20 25 30	

aga gtt aat ctc agc cac caa tct cac cga ctc aga aac tcc aat tct	144
Arg Val Asn Leu Ser His Gln Ser His Arg Leu Arg Asn Ser Asn Ser	
35 40 45	

cgt ctc act tgc act gct act tct tct tcc acc att gag gaa caa cgg	192
Arg Leu Thr Cys Thr Ala Thr Ser Ser Ser Thr Ile Glu Glu Gln Arg	
50 55 60	

aag aag aaa gat gga tca gga acg aaa gtg agg ttg aat gtg agg tta	240
Lys Lys Lys Asp Gly Ser Gly Thr Lys Val Arg Leu Asn Val Arg Leu	
65 70 75 80	

gat cat caa gtt aat ttt ggt gac cat gtg gct atg ttt gga tca gct	288
Asp His Gln Val Asn Phe Gly Asp His Val Ala Met Phe Gly Ser Ala	
85 90 95	

aaa gag att ggt tca tgg aaa aag aaa tcg cct ttg aat tgg agt gag	336
Lys Glu Ile Gly Ser Trp Lys Lys Lys Ser Pro Leu Asn Trp Ser Glu	
100 105 110	

aat gga tgg gtt tgt gag ttg gaa ctt gac ggt ggt cag gtt ttg gag	384
Asn Gly Trp Val Cys Glu Leu Glu Leu Asp Gly Gly Gln Val Leu Glu	
115 120 125	

tat aag ttt gtc att gtt aag aat gat ggt tca ctt tca tgg gaa tct Tyr Lys Phe Val Ile Val Lys Asn Asp Gly Ser Leu Ser Trp Glu Ser 130 135 140	432
ggg gat aat cgt gtc ctt aag gtt cca aat tct ggg aat ttt tct gtt Gly Asp Asn Arg Val Leu Lys Val Pro Asn Ser Gly Asn Phe Ser Val 145 150 155 160	480
gtt tgt cat tgg gat gct act aga gaa acc ctt gat ttg cct cag gag Val Cys His Trp Asp Ala Thr Arg Glu Thr Leu Asp Leu Pro Gln Glu 165 170 175	528
gtt ggt aat gat gat gat gtt ggt gat ggt ggg cat gag agg gat aat Val Gly Asn Asp Asp Asp Val Gly Asp Gly Gly His Glu Arg Asp Asn 180 185 190	576
cat gat gtt ggt gat gat aga gta gtg gga agt gaa aat ggt gcg cag His Asp Val Gly Asp Asp Arg Val Val Gly Ser Glu Asn Gly Ala Gln 195 200 205	624
ctt cag aag agt aca ttg ggt ggg caa tgg caa ggt aaa gat gcg tcc Leu Gln Lys Ser Thr Leu Gly Gly Gln Trp Gln Gly Lys Asp Ala Ser 210 215 220	672
ttt atg cgt tct aat gat cat ggt aac aga gaa gtt ggt aga aat tgg Phe Met Arg Ser Asn Asp His Gly Asn Arg Glu Val Gly Arg Asn Trp 225 230 235 240	720
gat act agt ggt ctt gaa ggc aca gct ctt aag atg gtt gag ggt gat Asp Thr Ser Gly Leu Glu Gly Thr Ala Leu Lys Met Val Glu Gly Asp 245 250 255	768
cgc aac tct aag aac tgg tgg aga aag ctt gaa atg gta cgc gag gtt Arg Asn Ser Lys Asn Trp Trp Arg Lys Leu Glu Met Val Arg Glu Val 260 265 270	816
ata gtt ggg agt gtt gag agg gag gaa cga ttg aag gcg ctc ata tac Ile Val Gly Ser Val Glu Arg Glu Glu Arg Leu Lys Ala Leu Ile Tyr 275 280 285	864
tct gca att tat ttg aag tgg ata aac aca ggt cag att cct tgt ttt Ser Ala Ile Tyr Leu Lys Trp Ile Asn Thr Gly Gln Ile Pro Cys Phe 290 295 300	912
gaa gat gga ggg cat cac cgt cca aac agg cat gcc gag att tcc aga Glu Asp Gly Gly His His Arg Pro Asn Arg His Ala Glu Ile Ser Arg 305 310 315 320	960
ctt ata ttc cgt gag ttg gag cac att tgc agt aag aaa gat gct act Leu Ile Phe Arg Glu Leu Glu His Ile Cys Ser Lys Lys Asp Ala Thr 325 330 335	1008
cca gag gaa gtg ctt gtt gct cgg aaa atc cat ccg tgt tta cct tct Pro Glu Glu Val Leu Val Ala Arg Lys Ile His Pro Cys Leu Pro Ser 340 345 350	1056
ttc aaa gca gag ttt act gca gct gtc cct cta act cgg att agg gac	1104

Phe Lys Ala Glu Phe Thr Ala Ala Val Pro Leu Thr Arg Ile Arg Asp 355 360 365	
ata gcc cat cgg aat gat att cct cat gat ctc aag caa gaa atc aag Ile Ala His Arg Asn Asp Ile Pro His Asp Leu Lys Gln Glu Ile Lys 370 375 380	1152
cat acg ata caa aat aag ctt cac cgg aat gct ggt cca gaa gat cta His Thr Ile Gln Asn Lys Leu His Arg Asn Ala Gly Pro Glu Asp Leu 385 390 395 400	1200
att gca aca gaa gca atg ctt caa cga att acc gag acc cca gga aaa Ile Ala Thr Glu Ala Met Leu Gln Arg Ile Thr Glu Thr Pro Gly Lys 405 410 415	1248
tat agt gga gac ttt gtg gag cag ttt aaa ata ttc cat aat gag ctt Tyr Ser Gly Asp Phe Val Glu Gln Phe Lys Ile Phe His Asn Glu Leu 420 425 430	1296
aaa gat ttc ttt aat gct gga agt ctc act gaa cag ctt gat tct atg Lys Asp Phe Phe Asn Ala Gly Ser Leu Thr Glu Gln Leu Asp Ser Met 435 440 445	1344
aaa att tct atg gat gat aga ggt ctt tct gcg ctc aat ttg ttt ttt Lys Ile Ser Met Asp Asp Arg Gly Leu Ser Ala Leu Asn Leu Phe Phe 450 455 460	1392
gaa tgt aaa aag cgc ctt gac aca tca gga gaa tca agc aat gtt ttg Glu Cys Lys Lys Arg Leu Asp Thr Ser Gly Glu Ser Ser Asn Val Leu 465 470 475 480	1440
gag ttg att aaa acc atg cat tct cta gct tct tta aga gaa aca att Glu Leu Ile Lys Thr Met His Ser Leu Ala Ser Leu Arg Glu Thr Ile 485 490 495	1488
ata aag gaa ctt aat agc ggc ttg cga aat gat gct cct gat act gcc Ile Lys Glu Leu Asn Ser Gly Leu Arg Asn Asp Ala Pro Asp Thr Ala 500 505 510	1536
att gca atg cgc cag aag tgg cgc ctt tgt gag atc ggc ctc gag gac Ile Ala Met Arg Gln Lys Trp Arg Leu Cys Glu Ile Gly Leu Glu Asp 515 520 525	1584
tac ttt ttt gtt cta cta agc aga ttc ctc aat gct ctt gaa act atg Tyr Phe Phe Val Leu Leu Ser Arg Phe Leu Asn Ala Leu Glu Thr Met 530 535 540	1632
gga gga gct gat caa ctg gca aaa gat gtg gga tca aga aac gtt gcc Gly Gly Ala Asp Gln Leu Ala Lys Asp Val Gly Ser Arg Asn Val Ala 545 550 555 560	1680
tca tgg aat gat cca cta gat gct ttg gtg ttg ggt gtt cac caa gta Ser Trp Asn Asp Pro Leu Asp Ala Leu Val Leu Gly Val His Gln Val 565 570 575	1728
ggt cta tct ggt tgg aag caa gaa gaa tgt tta gcc att gga aat gaa Gly Leu Ser Gly Trp Lys Gln Glu Glu Cys Leu Ala Ile Gly Asn Glu	1776

580	585	590	
ctc ctt gct tgg cga gaa agg gac cta ctt gaa aaa gaa ggg gaa gag Leu Leu Ala Trp Arg Glu Arg Asp Leu Leu Glu Lys Glu Gly Glu Glu 595 600 605			1824
gat gga aaa aca att tgg gcc atg agg ctg aaa gca act ctt gat cga Asp Gly Lys Thr Ile Trp Ala Met Arg Leu Lys Ala Thr Leu Asp Arg 610 615 620			1872
gca cgc aga tta aca gca gaa tat tct gat ttg ctt ctt caa ata ttt Ala Arg Arg Leu Thr Ala Glu Tyr Ser Asp Leu Leu Leu Gln Ile Phe 625 630 635 640			1920
cct cct aat gtg gag att tta gga aaa gct cta gga att cca gag aat Pro Pro Asn Val Glu Ile Leu Gly Lys Ala Leu Gly Ile Pro Glu Asn 645 650 655			1968
agt gtc aag acc tat aca gaa gca gag att cgt gct gga att att ttc Ser Val Lys Thr Tyr Thr Glu Ala Glu Ile Arg Ala Gly Ile Ile Phe 660 665 670			2016
cag atc tca aag ctc tgc act gtt ctt cta aaa gct gta aga aat tca Gln Ile Ser Lys Leu Cys Thr Val Leu Leu Lys Ala Val Arg Asn Ser 675 680 685			2064
ctt ggt tct gag ggc tgg gat gtc gtt gta cct gga tgc acg tct ggg Leu Gly Ser Glu Gly Trp Asp Val Val Val Pro Gly Ser Thr Ser Gly 690 695 700			2112
aca tta gtt cag gtt gag agc att gtt ccg gga tca ttg cca gca act Thr Leu Val Gln Val Glu Ser Ile Val Pro Gly Ser Leu Pro Ala Thr 705 710 715 720			2160
tct ggt ggt cct att att ctc ttg gtc aat aaa gct gat ggc gat gaa Ser Gly Gly Pro Ile Ile Leu Leu Val Asn Lys Ala Asp Gly Asp Glu 725 730 735			2208
gag gta agt gct gct aat ggg aac ata gct gga gtc atg ctt ctg cag Glu Val Ser Ala Ala Asn Gly Asn Ile Ala Gly Val Met Leu Leu Gln 740 745 750			2256
gag ctg cct cac ttg tct cac ctt ggc gtt aga gcg cgg cag gag aaa Glu Leu Pro His Leu Ser His Leu Gly Val Arg Ala Arg Gln Glu Lys 755 760 765			2304
att gtc ttt gtg aca tgt gat gat gat gac aag gtt gct gat ata cga Ile Val Phe Val Thr Cys Asp Asp Asp Asp Lys Val Ala Asp Ile Arg 770 775 780			2352
cga ctt gtg gga aaa ttt gtg agg ttg gaa gca tct cca agt cat gtg Arg Leu Val Gly Lys Phe Val Arg Leu Glu Ala Ser Pro Ser His Val 785 790 795 800			2400
aat ctg ata ctt tca act gag ggt agg agt cgc act tcc aaa tcc agt Asn Leu Ile Leu Ser Thr Glu Gly Arg Ser Arg Thr Ser Lys Ser Ser 805 810 815			2448

gcg acc aaa aaa acg gat aag aac agc tta tct aag aaa aaa aca gat Ala Thr Lys Lys Thr Asp Lys Asn Ser Leu Ser Lys Lys Lys Thr Asp 820 825 830	2496
aag aag agc tta tct atc gat gat gaa gaa tca aag cct ggt tcc tca Lys Lys Ser Leu Ser Ile Asp Asp Glu Glu Ser Lys Pro Gly Ser Ser 835 840 845	2544
tct tcc aat agc ctc ctt tac tct tcc aag gat atc cct agt gga gga Ser Ser Asn Ser Leu Leu Tyr Ser Ser Lys Asp Ile Pro Ser Gly Gly 850 855 860	2592
atc ata gca ctt gct gat gca gat gta cca act tct ggt tca aaa tct Ile Ile Ala Leu Ala Asp Ala Asp Val Pro Thr Ser Gly Ser Lys Ser 865 870 875 880	2640
gct gca tgt ggt ctt ctt gca tct tta gca gaa gcc tct agt aaa gtg Ala Ala Cys Gly Leu Leu Ala Ser Leu Ala Glu Ala Ser Ser Lys Val 885 890 895	2688
cac agc gaa cac gga gtt ccg gca tca ttt aag gtt cca act gga gtt His Ser Glu His Gly Val Pro Ala Ser Phe Lys Val Pro Thr Gly Val 900 905 910	2736
gtc ata cct ttt gga tcg atg gaa tta gct tta aag caa aat aat tcg Val Ile Pro Phe Gly Ser Met Glu Leu Ala Leu Lys Gln Asn Asn Ser 915 920 925	2784
gaa gaa aag ttt gcg tct ttg cta gaa aaa cta gaa acc gcc aga cct Glu Glu Lys Phe Ala Ser Leu Leu Glu Lys Leu Glu Thr Ala Arg Pro 930 935 940	2832
gag ggt ggt gag cta gac gac ata tgt gac cag atc cat gaa gtg atg Glu Gly Gly Glu Leu Asp Asp Ile Cys Asp Gln Ile His Glu Val Met 945 950 955 960	2880
aaa acg ttg caa gtg cct aaa gaa aca atc aac agc ata agc aaa gcg Lys Thr Leu Gln Val Pro Lys Glu Thr Ile Asn Ser Ile Ser Lys Ala 965 970 975	2928
ttt ctc aaa gat gct cgt ctc att gtt cgt tca agt gct aac gtc gag Phe Leu Lys Asp Ala Arg Leu Ile Val Arg Ser Ser Ala Asn Val Glu 980 985 990	2976
gac tta gcc gga atg tca gct gca gga ctc tat gaa tca atc cct aac Asp Leu Ala Gly Met Ser Ala Ala Gly Leu Tyr Glu Ser Ile Pro Asn 995 1000 1005	3024
gtg agt ccc tcg gat cct ttg gtg ttt tca gat tcg gtt tgc caa Val Ser Pro Ser Asp Pro Leu Val Phe Ser Asp Ser Val Cys Gln 1010 1015 1020	3069
gtt tgg gct tct ctc tac aca aga aga gct gtt cta agc cgt aga Val Trp Ala Ser Leu Tyr Thr Arg Arg Ala Val Leu Ser Arg Arg 1025 1030 1035	3114



gct gct ggt gtc tct caa aga gaa gct tca atg gct gtt ctc gtt Ala Ala Gly Val Ser Gln Arg Glu Ala Ser Met Ala Val Leu Val 1040 1045 1050	3159
caa gaa atg ctt tcg ccg gac tta tca ttc gtt ctg cac aca gtg Gln Glu Met Leu Ser Pro Asp Leu Ser Phe Val Leu His Thr Val 1055 1060 1065	3204
agt cca gct gat ccg gac agt aac ctt gtg gaa gcc gag atc gct Ser Pro Ala Asp Pro Asp Ser Asn Leu Val Glu Ala Glu Ile Ala 1070 1075 1080	3249
cct ggt tta ggt gag act tta gct tca gga aca aga gga aca cca Pro Gly Leu Gly Glu Thr Leu Ala Ser Gly Thr Arg Gly Thr Pro 1085 1090 1095	3294
tgg aga ctc gct tcg ggt aag ctc gac ggg att gta caa acc tta Trp Arg Leu Ala Ser Gly Lys Leu Asp Gly Ile Val Gln Thr Leu 1100 1105 1110	3339
gct ttc gca aac ttc agc gaa gag ctt ctt gtg tca gga aca ggt Ala Phe Ala Asn Phe Ser Glu Glu Leu Leu Val Ser Gly Thr Gly 1115 1120 1125	3384
cct gct gat gga aaa tac gtt cgg ttg acc gtg gac tat agc aaa Pro Ala Asp Gly Lys Tyr Val Arg Leu Thr Val Asp Tyr Ser Lys 1130 1135 1140	3429
aaa cgt tta act gtt gac tcg gtg ttt aga cag cag ctc ggt cag Lys Arg Leu Thr Val Asp Ser Val Phe Arg Gln Gln Leu Gly Gln 1145 1150 1155	3474
aga ctc ggt tcg gtt ggt ttc ttc ttg gaa aga aac ttt ggc tgt Arg Leu Gly Ser Val Gly Phe Phe Leu Glu Arg Asn Phe Gly Cys 1160 1165 1170	3519
gct caa gac gtt gaa ggt tgt ttg gtt ggt gaa gat gtt tac att Ala Gln Asp Val Glu Gly Cys Leu Val Gly Glu Asp Val Tyr Ile 1175 1180 1185	3564
ggt cag tca agg cca caa cct ctg tag Val Gln Ser Arg Pro Gln Pro Leu 1190 1195	3591

<210> 2  
 <211> 1196  
 <212> PRT  
 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 2

Met	Glu	Ser	Ile	Gly	Ser	His	Cys	Cys	Ser	Ser	Pro	Phe	Thr	Phe	Ile
1				5					10					15	

Thr Arg Asn Ser Ser Ser Ser Leu Pro Arg Leu Val Asn Ile Thr His

20

25

30

Arg Val Asn Leu Ser His Gln Ser His Arg Leu Arg Asn Ser Asn Ser  
 35 40 45

Arg Leu Thr Cys Thr Ala Thr Ser Ser Ser Thr Ile Glu Glu Gln Arg  
 50 55 60

Lys Lys Lys Asp Gly Ser Gly Thr Lys Val Arg Leu Asn Val Arg Leu  
 65 70 75 80

Asp His Gln Val Asn Phe Gly Asp His Val Ala Met Phe Gly Ser Ala  
 85 90 95

Lys Glu Ile Gly Ser Trp Lys Lys Lys Ser Pro Leu Asn Trp Ser Glu  
 100 105 110

Asn Gly Trp Val Cys Glu Leu Glu Leu Asp Gly Gly Gln Val Leu Glu  
 115 120 125

Tyr Lys Phe Val Ile Val Lys Asn Asp Gly Ser Leu Ser Trp Glu Ser  
 130 135 140

Gly Asp Asn Arg Val Leu Lys Val Pro Asn Ser Gly Asn Phe Ser Val  
 145 150 155 160

Val Cys His Trp Asp Ala Thr Arg Glu Thr Leu Asp Leu Pro Gln Glu  
 165 170 175

Val Gly Asn Asp Asp Asp Val Gly Asp Gly Gly His Glu Arg Asp Asn  
 180 185 190

His Asp Val Gly Asp Asp Arg Val Val Gly Ser Glu Asn Gly Ala Gln  
 195 200 205

Leu Gln Lys Ser Thr Leu Gly Gly Gln Trp Gln Gly Lys Asp Ala Ser  
 210 215 220

Phe Met Arg Ser Asn Asp His Gly Asn Arg Glu Val Gly Arg Asn Trp  
 225 230 235 240

Asp Thr Ser Gly Leu Glu Gly Thr Ala Leu Lys Met Val Glu Gly Asp  
 245 250 255

Arg Asn Ser Lys Asn Trp Trp Arg Lys Leu Glu Met Val Arg Glu Val  
260 265 270

Ile Val Gly Ser Val Glu Arg Glu Glu Arg Leu Lys Ala Leu Ile Tyr  
275 280 285

Ser Ala Ile Tyr Leu Lys Trp Ile Asn Thr Gly Gln Ile Pro Cys Phe  
290 295 300

Glu Asp Gly Gly His His Arg Pro Asn Arg His Ala Glu Ile Ser Arg  
305 310 315 320

Leu Ile Phe Arg Glu Leu Glu His Ile Cys Ser Lys Lys Asp Ala Thr  
325 330 335

Pro Glu Glu Val Leu Val Ala Arg Lys Ile His Pro Cys Leu Pro Ser  
340 345 350

Phe Lys Ala Glu Phe Thr Ala Ala Val Pro Leu Thr Arg Ile Arg Asp  
355 360 365

Ile Ala His Arg Asn Asp Ile Pro His Asp Leu Lys Gln Glu Ile Lys  
370 375 380

His Thr Ile Gln Asn Lys Leu His Arg Asn Ala Gly Pro Glu Asp Leu  
385 390 395 400

Ile Ala Thr Glu Ala Met Leu Gln Arg Ile Thr Glu Thr Pro Gly Lys  
405 410 415

Tyr Ser Gly Asp Phe Val Glu Gln Phe Lys Ile Phe His Asn Glu Leu  
420 425 430

Lys Asp Phe Phe Asn Ala Gly Ser Leu Thr Glu Gln Leu Asp Ser Met  
435 440 445

Lys Ile Ser Met Asp Asp Arg Gly Leu Ser Ala Leu Asn Leu Phe Phe  
450 455 460

Glu Cys Lys Lys Arg Leu Asp Thr Ser Gly Glu Ser Ser Asn Val Leu  
465 470 475 480

Glu Leu Ile Lys Thr Met His Ser Leu Ala Ser Leu Arg Glu Thr Ile  
485 490 495

Ile Lys Glu Leu Asn Ser Gly Leu Arg Asn Asp Ala Pro Asp Thr Ala  
500 505 510

Ile Ala Met Arg Gln Lys Trp Arg Leu Cys Glu Ile Gly Leu Glu Asp  
515 520 525

Tyr Phe Phe Val Leu Leu Ser Arg Phe Leu Asn Ala Leu Glu Thr Met  
530 535 540

Gly Gly Ala Asp Gln Leu Ala Lys Asp Val Gly Ser Arg Asn Val Ala  
545 550 555 560

Ser Trp Asn Asp Pro Leu Asp Ala Leu Val Leu Gly Val His Gln Val  
565 570 575

Gly Leu Ser Gly Trp Lys Gln Glu Glu Cys Leu Ala Ile Gly Asn Glu  
580 585 590

Leu Leu Ala Trp Arg Glu Arg Asp Leu Leu Glu Lys Glu Gly Glu Glu  
595 600 605

Asp Gly Lys Thr Ile Trp Ala Met Arg Leu Lys Ala Thr Leu Asp Arg  
610 615 620

Ala Arg Arg Leu Thr Ala Glu Tyr Ser Asp Leu Leu Leu Gln Ile Phe  
625 630 635 640

Pro Pro Asn Val Glu Ile Leu Gly Lys Ala Leu Gly Ile Pro Glu Asn  
645 650 655

Ser Val Lys Thr Tyr Thr Glu Ala Glu Ile Arg Ala Gly Ile Ile Phe  
660 665 670

Gln Ile Ser Lys Leu Cys Thr Val Leu Leu Lys Ala Val Arg Asn Ser  
675 680 685

Leu Gly Ser Glu Gly Trp Asp Val Val Val Pro Gly Ser Thr Ser Gly  
690 695 700

Thr Leu Val Gln Val Glu Ser Ile Val Pro Gly Ser Leu Pro Ala Thr  
705 710 715 720

Ser Gly Gly Pro Ile Ile Leu Leu Val Asn Lys Ala Asp Gly Asp Glu  
725 730 735

Glu Val Ser Ala Ala Asn Gly Asn Ile Ala Gly Val Met Leu Leu Gln  
740 745 750

Glu Leu Pro His Leu Ser His Leu Gly Val Arg Ala Arg Gln Glu Lys  
755 760 765

Ile Val Phe Val Thr Cys Asp Asp Asp Asp Lys Val Ala Asp Ile Arg  
770 775 780

Arg Leu Val Gly Lys Phe Val Arg Leu Glu Ala Ser Pro Ser His Val  
785 790 795 800

Asn Leu Ile Leu Ser Thr Glu Gly Arg Ser Arg Thr Ser Lys Ser Ser  
805 810 815

Ala Thr Lys Lys Thr Asp Lys Asn Ser Leu Ser Lys Lys Lys Thr Asp  
820 825 830

Lys Lys Ser Leu Ser Ile Asp Asp Glu Glu Ser Lys Pro Gly Ser Ser  
835 840 845

Ser Ser Asn Ser Leu Leu Tyr Ser Ser Lys Asp Ile Pro Ser Gly Gly  
850 855 860

Ile Ile Ala Leu Ala Asp Ala Asp Val Pro Thr Ser Gly Ser Lys Ser  
865 870 875 880

Ala Ala Cys Gly Leu Leu Ala Ser Leu Ala Glu Ala Ser Ser Lys Val  
885 890 895

His Ser Glu His Gly Val Pro Ala Ser Phe Lys Val Pro Thr Gly Val  
900 905 910

Val Ile Pro Phe Gly Ser Met Glu Leu Ala Leu Lys Gln Asn Asn Ser  
915 920 925

Glu Glu Lys Phe Ala Ser Leu Leu Glu Lys Leu Glu Thr Ala Arg Pro



930

935

940

Glu Gly Gly Glu Leu Asp Asp Ile Cys Asp Gln Ile His Glu Val Met  
 945 950 955 960

Lys Thr Leu Gln Val Pro Lys Glu Thr Ile Asn Ser Ile Ser Lys Ala  
 965 970 975

Phe Leu Lys Asp Ala Arg Leu Ile Val Arg Ser Ser Ala Asn Val Glu  
 980 985 990

Asp Leu Ala Gly Met Ser Ala Ala Gly Leu Tyr Glu Ser Ile Pro Asn  
 995 1000 1005

Val Ser Pro Ser Asp Pro Leu Val Phe Ser Asp Ser Val Cys Gln  
 1010 1015 1020

Val Trp Ala Ser Leu Tyr Thr Arg Arg Ala Val Leu Ser Arg Arg  
 1025 1030 1035

Ala Ala Gly Val Ser Gln Arg Glu Ala Ser Met Ala Val Leu Val  
 1040 1045 1050

Gln Glu Met Leu Ser Pro Asp Leu Ser Phe Val Leu His Thr Val  
 1055 1060 1065

Ser Pro Ala Asp Pro Asp Ser Asn Leu Val Glu Ala Glu Ile Ala  
 1070 1075 1080

Pro Gly Leu Gly Glu Thr Leu Ala Ser Gly Thr Arg Gly Thr Pro  
 1085 1090 1095

Trp Arg Leu Ala Ser Gly Lys Leu Asp Gly Ile Val Gln Thr Leu  
 1100 1105 1110

Ala Phe Ala Asn Phe Ser Glu Glu Leu Leu Val Ser Gly Thr Gly  
 1115 1120 1125

Pro Ala Asp Gly Lys Tyr Val Arg Leu Thr Val Asp Tyr Ser Lys  
 1130 1135 1140

Lys Arg Leu Thr Val Asp Ser Val Phe Arg Gln Gln Leu Gly Gln  
 1145 1150 1155

Arg Leu Gly Ser Val Gly Phe Phe Leu Glu Arg Asn Phe Gly Cys  
 1160 1165 1170

Ala Gln Asp Val Glu Gly Cys Leu Val Gly Glu Asp Val Tyr Ile  
 1175 1180 1185

Val Gln Ser Arg Pro Gln Pro Leu  
 1190 1195

<210> 3  
 <211> 3644  
 <212> DNA  
 <213> Oryza sativa

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (13) .. (3633)  
 <223>

<400> 3  
 cgaggaggat ca atg acg tcg ctg cgg ccc ctc gaa acc tcg ctc tcc ata 51  
 Met Thr Ser Leu Arg Pro Leu Glu Thr Ser Leu Ser Ile  
 1 5 10

ggc ggc agg ccg cgc cgt ggt ctc gtc ctc ccg ccg ccc gga gtc ggt 99  
 Gly Gly Arg Pro Arg Arg Gly Leu Val Leu Pro Pro Pro Gly Val Gly  
 15 20 25

gcg ggt gtg ctg ctc cgc cgg gga gcg atg gcg ctc cct ggg cgg cgc 147  
 Ala Gly Val Leu Leu Arg Arg Gly Ala Met Ala Leu Pro Gly Arg Arg  
 30 35 40 45

ggc ttc gcg tgc cgc ggg aga tcc gcg gcc tcg gcg gca gag aga aca 195  
 Gly Phe Ala Cys Arg Gly Arg Ser Ala Ala Ser Ala Ala Glu Arg Thr  
 50 55 60

aag gag aaa aag aga aga gat tct tca aag cag cca ttg gtg cat ctc 243  
 Lys Glu Lys Lys Arg Arg Asp Ser Ser Lys Gln Pro Leu Val His Leu  
 65 70 75

cag gtt tgt cta gag cac cag gtt aag ttt ggt gag cat gta ggc att 291  
 Gln Val Cys Leu Glu His Gln Val Lys Phe Gly Glu His Val Gly Ile  
 80 85 90

atc ggt tcc aca aag gag ctt ggt tca tgg gag gag cag gtt gaa ctg 339  
 Ile Gly Ser Thr Lys Glu Leu Gly Ser Trp Glu Glu Gln Val Glu Leu  
 95 100 105

gaa tgg act aca aat ggt tgg gtc tgc cag ctt aag ctc cct gga gaa 387  
 Glu Trp Thr Thr Asn Gly Trp Val Cys Gln Leu Lys Leu Pro Gly Glu  
 110 115 120 125

aca ctt gtg gag ttt aaa ttt gtt ata ttt ttg gtg gga gga aaa gat Thr Leu Val Glu Phe Lys Phe Val Ile Phe Leu Val Gly Gly Lys Asp 130 135 140	435
aaa ata tgg gaa gat ggt aat aac cgt gtt gtt gag ctg ccg aag gat Lys Ile Trp Glu Asp Gly Asn Asn Arg Val Val Glu Leu Pro Lys Asp 145 150 155	483
ggt aag ttt gat ata gta tgc cac tgg aat aga aca gaa gag cca tta Gly Lys Phe Asp Ile Val Cys His Trp Asn Arg Thr Glu Glu Pro Leu 160 165 170	531
gaa ctt tta gga aca cca aag ttt gag ttg gtc gga gaa gct gaa aag Glu Leu Leu Gly Thr Pro Lys Phe Glu Leu Val Gly Glu Ala Glu Lys 175 180 185	579
aat act ggc gag gat gct tca gca tct gta act ttt gca cct gaa aaa Asn Thr Gly Glu Asp Ala Ser Ala Ser Val Thr Phe Ala Pro Glu Lys 190 195 200 205	627
gtt caa gat att tca gtt gtt gag aat ggt gat cca gca cca gag gcc Val Gln Asp Ile Ser Val Val Glu Asn Gly Asp Pro Ala Pro Glu Ala 210 215 220	675
gag tca agc aaa ttt ggt ggg caa tgg caa gga agt aaa act gtt ttc Glu Ser Ser Lys Phe Gly Gly Gln Trp Gln Gly Ser Lys Thr Val Phe 225 230 235	723
atg aga tca aat gag cat ctg aat aag gag gct gat agg atg tgg gat Met Arg Ser Asn Glu His Leu Asn Lys Glu Ala Asp Arg Met Trp Asp 240 245 250	771
aca act ggg ctt gat gga ata gca ctg aaa ctg gtg gag ggc gat aaa Thr Thr Gly Leu Asp Gly Ile Ala Leu Lys Leu Val Glu Gly Asp Lys 255 260 265	819
gca tcc agg aac tgg tgg cgg aag tta gag gtt gtt cgc ggg ata ttg Ala Ser Arg Asn Trp Trp Arg Lys Leu Glu Val Val Arg Gly Ile Leu 270 275 280 285	867
tca gaa tct ttt gat gac cag agt cgt ctg ggg gcc ctt gta tac tca Ser Glu Ser Phe Asp Asp Gln Ser Arg Leu Gly Ala Leu Val Tyr Ser 290 295 300	915
gct att tat ctg aag tgg att tat aca ggt cag ata tcg tgc ttt gaa Ala Ile Tyr Leu Lys Trp Ile Tyr Thr Gly Gln Ile Ser Cys Phe Glu 305 310 315	963
gat ggt ggc cac cat cgg cct aac aaa cat gct gag ata tcg agg caa Asp Gly Gly His His Arg Pro Asn Lys His Ala Glu Ile Ser Arg Gln 320 325 330	1011
ata ttc cgt gaa ctt gaa atg atg tat tat ggg aaa acc aca tca gcc Ile Phe Arg Glu Leu Glu Met Met Tyr Tyr Gly Lys Thr Thr Ser Ala 335 340 345	1059

aag gat gtt ctc gtg att cgc aaa att cat ccc ttt tta cct tca ttt Lys Asp Val Leu Val Ile Arg Lys Ile His Pro Phe Leu Pro Ser Phe 350 355 360 365	1107
aag tca gag ttt aca gcc tct gtc cct cta aca cga att cgt gat att Lys Ser Glu Phe Thr Ala Ser Val Pro Leu Thr Arg Ile Arg Asp Ile 370 375 380	1155
gct cac cgg aat gac atc cca cat gat ctc aag caa gaa atc aag cat Ala His Arg Asn Asp Ile Pro His Asp Leu Lys Gln Glu Ile Lys His 385 390 395	1203
act ata caa aac aaa ctt cat cgt aat gct gga cct gag gat ctt att Thr Ile Gln Asn Lys Leu His Arg Asn Ala Gly Pro Glu Asp Leu Ile 400 405 410	1251
gct aca gaa gtc atg ctt gct agg att act aag acc cct gga gaa tac Ala Thr Glu Val Met Leu Ala Arg Ile Thr Lys Thr Pro Gly Glu Tyr 415 420 425	1299
agt gaa aca ttt gtt gaa caa ttc acg ata ttt tat agc gaa cta aaa Ser Glu Thr Phe Val Glu Gln Phe Thr Ile Phe Tyr Ser Glu Leu Lys 430 435 440 445	1347
gat ttc ttc aat gct ggc agc cta ttt gag caa ctg gag tcc atc aag Asp Phe Phe Asn Ala Gly Ser Leu Phe Glu Gln Leu Glu Ser Ile Lys 450 455 460	1395
gaa tct ctg aac gag tca ggc tta gaa gtt ctc tca tcc ttt gtg gaa Glu Ser Leu Asn Glu Ser Gly Leu Glu Val Leu Ser Ser Phe Val Glu 465 470 475	1443
acc aaa agg agt ttg gac caa gtg gat cat gca gaa gat ttg gat aaa Thr Lys Arg Ser Leu Asp Gln Val Asp His Ala Glu Asp Leu Asp Lys 480 485 490	1491
aat gat acc att caa att ttg atg act acc ttg caa tca tta tct tct Asn Asp Thr Ile Gln Ile Leu Met Thr Thr Leu Gln Ser Leu Ser Ser 495 500 505	1539
cta aga tcg gtt cta atg aag ggc ctt gaa agt ggc ctt aga aat gat Leu Arg Ser Val Leu Met Lys Gly Leu Glu Ser Gly Leu Arg Asn Asp 510 515 520 525	1587
gcg cct gat aat gct ata gca atg cga caa aag tgg cgc ctt tgt gaa Ala Pro Asp Asn Ala Ile Ala Met Arg Gln Lys Trp Arg Leu Cys Glu 530 535 540	1635
att agt ctt gag gat tat tca ttt gtt ctg tta agc aga ttc atc aat Ile Ser Leu Glu Asp Tyr Ser Phe Val Leu Leu Ser Arg Phe Ile Asn 545 550 555	1683
act ctt gaa gcc tta ggt gga tca gct tca ctt gca aag gat gta gct Thr Leu Glu Ala Leu Gly Gly Ser Ala Ser Leu Ala Lys Asp Val Ala 560 565 570	1731
aga aat act act cta tgg gat act act ctt gat gcc ctt gtc att ggc	1779

Arg Asn Thr Thr Leu Trp Asp Thr Thr Leu Asp Ala Leu Val Ile Gly	
575 580 585	
atc aat caa gtt agc ttt tca ggt tgg aaa aca gat gaa tgt att gcc	1827
Ile Asn Gln Val Ser Phe Ser Gly Trp Lys Thr Asp Glu Cys Ile Ala	
590 595 600 605	
ata ggg aat gag att ctt tcc tgg aag caa aaa ggt cta tct gaa agt	1875
Ile Gly Asn Glu Ile Leu Ser Trp Lys Gln Lys Gly Leu Ser Glu Ser	
610 615 620	
gaa ggt tgt gaa gat ggg aaa tat att tgg tca cta aga ctt aaa gct	1923
Glu Gly Cys Glu Asp Gly Lys Tyr Ile Trp Ser Leu Arg Leu Lys Ala	
625 630 635	
aca ctg gac aga gca cgg aga tta acg gaa gag tac tct gaa gca ctt	1971
Thr Leu Asp Arg Ala Arg Arg Leu Thr Glu Glu Tyr Ser Glu Ala Leu	
640 645 650	
ctt tct ata ttc cct gaa aaa gta atg gtt att ggg aaa gcc ctt gga	2019
Leu Ser Ile Phe Pro Glu Lys Val Met Val Ile Gly Lys Ala Leu Gly	
655 660 665	
ata cca gat aac agt gtg aga act tac aca gag gca gaa att cgt gct	2067
Ile Pro Asp Asn Ser Val Arg Thr Tyr Thr Glu Ala Glu Ile Arg Ala	
670 675 680 685	
ggc att gtt ttt cag gta tct aaa cta tgc aca gta ctt cag aaa gca	2115
Gly Ile Val Phe Gln Val Ser Lys Leu Cys Thr Val Leu Gln Lys Ala	
690 695 700	
att cga gaa gta ctt gga tca act ggc tgg gat gtt ctt gtt cct gga	2163
Ile Arg Glu Val Leu Gly Ser Thr Gly Trp Asp Val Leu Val Pro Gly	
705 710 715	
gtg gcc cat gga act ctg atg cgg gtg gaa aga att ctt cct gga tca	2211
Val Ala His Gly Thr Leu Met Arg Val Glu Arg Ile Leu Pro Gly Ser	
720 725 730	
tta cct tca tct gtc aaa gaa cct gtg gtt cta att gta gat aag gct	2259
Leu Pro Ser Ser Val Lys Glu Pro Val Val Leu Ile Val Asp Lys Ala	
735 740 745	
gat gga gat gaa gag gtc aaa gct gct ggg gat aat ata gtt ggt gtt	2307
Asp Gly Asp Glu Glu Val Lys Ala Ala Gly Asp Asn Ile Val Gly Val	
750 755 760 765	
att ctt ctt cag gaa cta cct cac ctt tca cat ctt ggt gtt aga gct	2355
Ile Leu Leu Gln Glu Leu Pro His Leu Ser His Leu Gly Val Arg Ala	
770 775 780	
cgt caa gag aat gtt gta ttt gta act tgt gaa tat gat gac aca gtt	2403
Arg Gln Glu Asn Val Val Phe Val Thr Cys Glu Tyr Asp Asp Thr Val	
785 790 795	
aca gat gtg tat ttg ctt gag gga aaa tat atc aga tta gaa gca tca	2451
Thr Asp Val Tyr Leu Leu Glu Gly Lys Tyr Ile Arg Leu Glu Ala Ser	

800	805	810	
tcc atc aat gtc aat ctc tca ata gtt tca gaa aaa aat gac aat gct Ser Ile Asn Val Asn Leu Ser Ile Val Ser Glu Lys Asn Asp Asn Ala 815 820 825			2499
gtc tct aca gaa cca aat agt aca ggg aat cca ttt caa cag aaa ctc Val Ser Thr Glu Pro Asn Ser Thr Gly Asn Pro Phe Gln Gln Lys Leu 830 835 840 845			2547
caa aat gaa ttc tct cta cca tcg gat atc gag atg cca ctg caa atg Gln Asn Glu Phe Ser Leu Pro Ser Asp Ile Glu Met Pro Leu Gln Met 850 855 860			2595
tct aag caa aaa agc aaa tca gga gtg aat ggt agt ttt gct gct ctt Ser Lys Gln Lys Ser Lys Ser Gly Val Asn Gly Ser Phe Ala Ala Leu 865 870 875			2643
gag ctt tca gaa gct tca gtg gaa tca gct ggt gca aaa gct gct gca Glu Leu Ser Glu Ala Ser Val Glu Ser Ala Gly Ala Lys Ala Ala Ala 880 885 890			2691
tgc aga act ctt tct gtt ctt gct tca ttg tct aat aaa gtc tat agt Cys Arg Thr Leu Ser Val Leu Ala Ser Leu Ser Asn Lys Val Tyr Ser 895 900 905			2739
gat caa gga gtt cca gca gcc ttt aga gtc cct tct ggt gct gtg ata Asp Gln Gly Val Pro Ala Ala Phe Arg Val Pro Ser Gly Ala Val Ile 910 915 920 925			2787
cca ttt gga tca atg gag gat gcg ctc aag aaa agt gga tca ctg gaa Pro Phe Gly Ser Met Glu Asp Ala Leu Lys Lys Ser Gly Ser Leu Glu 930 935 940			2835
tcc ttt aca agc ctt cta gaa aag att gaa aca gcc aaa gtc gaa aat Ser Phe Thr Ser Leu Leu Glu Lys Ile Glu Thr Ala Lys Val Glu Asn 945 950 955			2883
ggt gaa gtt gat agc ctg gcg ttg gag cta caa gca ata att tca cat Gly Glu Val Asp Ser Leu Ala Leu Glu Leu Gln Ala Ile Ile Ser His 960 965 970			2931
ctt tcc cca ccg gag gag act att ata ttt ctc aaa aga atc ttc cca Leu Ser Pro Pro Glu Glu Thr Ile Ile Phe Leu Lys Arg Ile Phe Pro 975 980 985			2979
cag gat gtc cgg ttg att gtt aga tct agt gct aat gtg gag gat ttg Gln Asp Val Arg Leu Ile Val Arg Ser Ser Ala Asn Val Glu Asp Leu 990 995 1000 1005			3027
gct ggt atg tca gct gct ggt ctc tat gat tca att ccc aat gtc Ala Gly Met Ser Ala Ala Gly Leu Tyr Asp Ser Ile Pro Asn Val 1010 1015 1020			3072
agt ctc atg gac cca tgt gcc ttt gga gct gcg gtt ggg aag gtt Ser Leu Met Asp Pro Cys Ala Phe Gly Ala Ala Val Gly Lys Val 1025 1030 1035			3117



tgg gct tct tta tac	aca agg aga gcc atc	cta agc cgt cga gcc	3162
Trp Ala Ser Leu Tyr	Thr Arg Arg Ala Ile	Leu Ser Arg Arg Ala	
1040	1045	1050	
gct ggt gtt tat cag	aga gac gcg aca atg	gct gtt ctt gtc caa	3207
Ala Gly Val Tyr Gln	Arg Asp Ala Thr Met	Ala Val Leu Val Gln	
1055	1060	1065	
gaa ata ctg cag cca	gat ctc tcc ttc gtg	ctt cat act gtt tgc	3252
Glu Ile Leu Gln Pro	Asp Leu Ser Phe Val	Leu His Thr Val Cys	
1070	1075	1080	
ccc gct gac cat gac	ccc aag gtt gtc cag	gct gag gtc gcc cct	3297
Pro Ala Asp His Asp	Pro Lys Val Val Gln	Ala Glu Val Ala Pro	
1085	1090	1095	
ggg ctg ggt gaa acg	ctt gct tca gga acc	cgt ggc acc ccg tgg	3342
Gly Leu Gly Glu Thr	Leu Ala Ser Gly Thr	Arg Gly Thr Pro Trp	
1100	1105	1110	
agg ctg tca tgt aac	aaa ttc gat gga aaa	gtt gcc act ctt gcc	3387
Arg Leu Ser Cys Asn	Lys Phe Asp Gly Lys	Val Ala Thr Leu Ala	
1115	1120	1125	
ttt tca aat ttc agt	gag gag atg gtg gtg	cac aac tct ggt cct	3432
Phe Ser Asn Phe Ser	Glu Glu Met Val Val	His Asn Ser Gly Pro	
1130	1135	1140	
gcc aat gga gaa gta	att cgt ctt act gtt	gat tac agc aag aag	3477
Ala Asn Gly Glu Val	Ile Arg Leu Thr Val	Asp Tyr Ser Lys Lys	
1145	1150	1155	
cca ttg tcg gtt gat	aca acc ttt agg aag	cag ttt ggt cag cga	3522
Pro Leu Ser Val Asp	Thr Thr Phe Arg Lys	Gln Phe Gly Gln Arg	
1160	1165	1170	
ctg gct gcg att ggc	cag tat ctg gag cag	aag ttc ggg agt gca	3567
Leu Ala Ala Ile Gly	Gln Tyr Leu Glu Gln	Lys Phe Gly Ser Ala	
1175	1180	1185	
cag gat gtg gaa ggt	tgc ctg gtt ggg aaa	gat att ttt ata gtg	3612
Gln Asp Val Glu Gly	Cys Leu Val Gly Lys	Asp Ile Phe Ile Val	
1190	1195	1200	
caa agc agg cca cag	cca tag aagccgaatt c		3644
Gln Ser Arg Pro Gln	Pro		
1205			

<210> 4  
 <211> 1206  
 <212> PRT  
 <213> Oryza sativa

<400> 4

Met Thr Ser Leu Arg Pro Leu Glu Thr Ser Leu Ser Ile Gly Gly Arg  
1 5 10 15

Pro Arg Arg Gly Leu Val Leu Pro Pro Pro Gly Val Gly Ala Gly Val  
20 25 30

Leu Leu Arg Arg Gly Ala Met Ala Leu Pro Gly Arg Arg Gly Phe Ala  
35 40 45

Cys Arg Gly Arg Ser Ala Ala Ser Ala Ala Glu Arg Thr Lys Glu Lys  
50 55 60

Lys Arg Arg Asp Ser Ser Lys Gln Pro Leu Val His Leu Gln Val Cys  
65 70 75 80

Leu Glu His Gln Val Lys Phe Gly Glu His Val Gly Ile Ile Gly Ser  
85 90 95

Thr Lys Glu Leu Gly Ser Trp Glu Glu Gln Val Glu Leu Glu Trp Thr  
100 105 110

Thr Asn Gly Trp Val Cys Gln Leu Lys Leu Pro Gly Glu Thr Leu Val  
115 120 125

Glu Phe Lys Phe Val Ile Phe Leu Val Gly Gly Lys Asp Lys Ile Trp  
130 135 140

Glu Asp Gly Asn Asn Arg Val Val Glu Leu Pro Lys Asp Gly Lys Phe  
145 150 155 160

Asp Ile Val Cys His Trp Asn Arg Thr Glu Glu Pro Leu Glu Leu Leu  
165 170 175

Gly Thr Pro Lys Phe Glu Leu Val Gly Glu Ala Glu Lys Asn Thr Gly  
180 185 190

Glu Asp Ala Ser Ala Ser Val Thr Phe Ala Pro Glu Lys Val Gln Asp  
195 200 205

Ile Ser Val Val Glu Asn Gly Asp Pro Ala Pro Glu Ala Glu Ser Ser  
210 215 220

Lys Phe Gly Gly Gln Trp Gln Gly Ser Lys Thr Val Phe Met Arg Ser

225	230	235	240
Asn Glu His Leu Asn Lys Glu Ala Asp Arg Met Trp Asp Thr Thr Gly	245	250	255
Leu Asp Gly Ile Ala Leu Lys Leu Val Glu Gly Asp Lys Ala Ser Arg	260	265	270
Asn Trp Trp Arg Lys Leu Glu Val Val Arg Gly Ile Leu Ser Glu Ser	275	280	285
Phe Asp Asp Gln Ser Arg Leu Gly Ala Leu Val Tyr Ser Ala Ile Tyr	290	295	300
Leu Lys Trp Ile Tyr Thr Gly Gln Ile Ser Cys Phe Glu Asp Gly Gly	305	310	315
His His Arg Pro Asn Lys His Ala Glu Ile Ser Arg Gln Ile Phe Arg	325	330	335
Glu Leu Glu Met Met Tyr Tyr Gly Lys Thr Thr Ser Ala Lys Asp Val	340	345	350
Leu Val Ile Arg Lys Ile His Pro Phe Leu Pro Ser Phe Lys Ser Glu	355	360	365
Phe Thr Ala Ser Val Pro Leu Thr Arg Ile Arg Asp Ile Ala His Arg	370	375	380
Asn Asp Ile Pro His Asp Leu Lys Gln Glu Ile Lys His Thr Ile Gln	385	390	395
Asn Lys Leu His Arg Asn Ala Gly Pro Glu Asp Leu Ile Ala Thr Glu	405	410	415
Val Met Leu Ala Arg Ile Thr Lys Thr Pro Gly Glu Tyr Ser Glu Thr	420	425	430
Phe Val Glu Gln Phe Thr Ile Phe Tyr Ser Glu Leu Lys Asp Phe Phe	435	440	445
Asn Ala Gly Ser Leu Phe Glu Gln Leu Glu Ser Ile Lys Glu Ser Leu	450	455	460

Asn Glu Ser Gly Leu Glu Val Leu Ser Ser Phe Val Glu Thr Lys Arg  
465 470 475 480

Ser Leu Asp Gln Val Asp His Ala Glu Asp Leu Asp Lys Asn Asp Thr  
485 490 495

Ile Gln Ile Leu Met Thr Thr Leu Gln Ser Leu Ser Ser Leu Arg Ser  
500 505 510

Val Leu Met Lys Gly Leu Glu Ser Gly Leu Arg Asn Asp Ala Pro Asp  
515 520 525

Asn Ala Ile Ala Met Arg Gln Lys Trp Arg Leu Cys Glu Ile Ser Leu  
530 535 540

Glu Asp Tyr Ser Phe Val Leu Leu Ser Arg Phe Ile Asn Thr Leu Glu  
545 550 555 560

Ala Leu Gly Gly Ser Ala Ser Leu Ala Lys Asp Val Ala Arg Asn Thr  
565 570 575

Thr Leu Trp Asp Thr Thr Leu Asp Ala Leu Val Ile Gly Ile Asn Gln  
580 585 590

Val Ser Phe Ser Gly Trp Lys Thr Asp Glu Cys Ile Ala Ile Gly Asn  
595 600 605

Glu Ile Leu Ser Trp Lys Gln Lys Gly Leu Ser Glu Ser Glu Gly Cys  
610 615 620

Glu Asp Gly Lys Tyr Ile Trp Ser Leu Arg Leu Lys Ala Thr Leu Asp  
625 630 635 640

Arg Ala Arg Arg Leu Thr Glu Glu Tyr Ser Glu Ala Leu Leu Ser Ile  
645 650 655

Phe Pro Glu Lys Val Met Val Ile Gly Lys Ala Leu Gly Ile Pro Asp  
660 665 670

Asn Ser Val Arg Thr Tyr Thr Glu Ala Glu Ile Arg Ala Gly Ile Val  
675 680 685

Phe Gln Val Ser Lys Leu Cys Thr Val Leu Gln Lys Ala Ile Arg Glu  
690 695 700

Val Leu Gly Ser Thr Gly Trp Asp Val Leu Val Pro Gly Val Ala His  
705 710 715 720

Gly Thr Leu Met Arg Val Glu Arg Ile Leu Pro Gly Ser Leu Pro Ser  
725 730 735

Ser Val Lys Glu Pro Val Val Leu Ile Val Asp Lys Ala Asp Gly Asp  
740 745 750

Glu Glu Val Lys Ala Ala Gly Asp Asn Ile Val Gly Val Ile Leu Leu  
755 760 765

Gln Glu Leu Pro His Leu Ser His Leu Gly Val Arg Ala Arg Gln Glu  
770 775 780

Asn Val Val Phe Val Thr Cys Glu Tyr Asp Asp Thr Val Thr Asp Val  
785 790 795 800

Tyr Leu Leu Glu Gly Lys Tyr Ile Arg Leu Glu Ala Ser Ser Ile Asn  
805 810 815

Val Asn Leu Ser Ile Val Ser Glu Lys Asn Asp Asn Ala Val Ser Thr  
820 825 830

Glu Pro Asn Ser Thr Gly Asn Pro Phe Gln Gln Lys Leu Gln Asn Glu  
835 840 845

Phe Ser Leu Pro Ser Asp Ile Glu Met Pro Leu Gln Met Ser Lys Gln  
850 855 860

Lys Ser Lys Ser Gly Val Asn Gly Ser Phe Ala Ala Leu Glu Leu Ser  
865 870 875 880

Glu Ala Ser Val Glu Ser Ala Gly Ala Lys Ala Ala Ala Cys Arg Thr  
885 890 895

Leu Ser Val Leu Ala Ser Leu Ser Asn Lys Val Tyr Ser Asp Gln Gly  
900 905 910

Val Pro Ala Ala Phe Arg Val Pro Ser Gly Ala Val Ile Pro Phe Gly  
915 920 925

Ser Met Glu Asp Ala Leu Lys Lys Ser Gly Ser Leu Glu Ser Phe Thr  
930 935 940

Ser Leu Leu Glu Lys Ile Glu Thr Ala Lys Val Glu Asn Gly Glu Val  
945 950 955 960

Asp Ser Leu Ala Leu Glu Leu Gln Ala Ile Ile Ser His Leu Ser Pro  
965 970 975

Pro Glu Glu Thr Ile Ile Phe Leu Lys Arg Ile Phe Pro Gln Asp Val  
980 985 990

Arg Leu Ile Val Arg Ser Ser Ala Asn Val Glu Asp Leu Ala Gly Met  
995 1000 1005

Ser Ala Ala Gly Leu Tyr Asp Ser Ile Pro Asn Val Ser Leu Met  
1010 1015 1020

Asp Pro Cys Ala Phe Gly Ala Ala Val Gly Lys Val Trp Ala Ser  
1025 1030 1035

Leu Tyr Thr Arg Arg Ala Ile Leu Ser Arg Arg Ala Ala Gly Val  
1040 1045 1050

Tyr Gln Arg Asp Ala Thr Met Ala Val Leu Val Gln Glu Ile Leu  
1055 1060 1065

Gln Pro Asp Leu Ser Phe Val Leu His Thr Val Cys Pro Ala Asp  
1070 1075 1080

His Asp Pro Lys Val Val Gln Ala Glu Val Ala Pro Gly Leu Gly  
1085 1090 1095

Glu Thr Leu Ala Ser Gly Thr Arg Gly Thr Pro Trp Arg Leu Ser  
1100 1105 1110

Cys Asn Lys Phe Asp Gly Lys Val Ala Thr Leu Ala Phe Ser Asn  
1115 1120 1125

Phe Ser Glu Glu Met Val Val His Asn Ser Gly Pro Ala Asn Gly



1130

1135

1140

Glu Val Ile Arg Leu Thr Val Asp Tyr Ser Lys Lys Pro Leu Ser  
1145 1150 1155

Val Asp Thr Thr Phe Arg Lys Gln Phe Gly Gln Arg Leu Ala Ala  
1160 1165 1170

Ile Gly Gln Tyr Leu Glu Gln Lys Phe Gly Ser Ala Gln Asp Val  
1175 1180 1185

Glu Gly Cys Leu Val Gly Lys Asp Ile Phe Ile Val Gln Ser Arg  
1190 1195 1200

Pro Gln Pro  
1205

<210> 5  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Oryza sativa, Arabidopsis thaliana, Sorghum bicolor

<400> 5

Leu Pro His Leu Ser His Leu Gly Val Arg Ala Arg  
1 5 10

<210> 6  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Hordeum vulgare

<400> 6

Ser Arg Arg Val Ala Gly Val  
1 5

<210> 7  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Hordeum vulgare

<400> 7

Val Glu Ala Glu Val Ala Pro  
1 5

<210> 8

<211> 9  
<212> PRT  
<213> Hordeum vulgare

<400> 8

His Thr Val Ser Pro Ser Asp His Asp  
1 5

<210> 9  
<211> 807  
<212> DNA  
<213> Hordeum vulgare

<220>  
<221> CDS  
<222> (3)..(590)  
<223>

<400> 9 47  
cg gca cga gga gtc ctc ccc aat gtg agc ctc tcg gac cca acc aac  
Ala Arg Gly Val Leu Pro Asn Val Ser Leu Ser Asp Pro Thr Asn  
1 5 10 15

ttc ggg tct gca gta gcg cgg gtc tgg gcc tcg ctg tac act cgg agg 95  
Phe Gly Ser Ala Val Ala Arg Val Trp Ala Ser Leu Tyr Thr Arg Arg  
20 25 30

gcc atc ctc agc cgc cgg gtg gct ggc gtg ccc cag agg gac gcc aag 143  
Ala Ile Leu Ser Arg Arg Val Ala Gly Val Pro Gln Arg Asp Ala Lys  
35 40 45

atg gct gtc ctg gtg cag gag atg ctg gag cca gag cta tcc ttc gtg 191  
Met Ala Val Leu Val Gln Glu Met Leu Glu Pro Glu Leu Ser Phe Val  
50 55 60

ctc cac acg gtc agc ccc tcg gac cac gac acc agg gtc gtc gag gct 239  
Leu His Thr Val Ser Pro Ser Asp His Asp Thr Arg Val Val Glu Ala  
65 70 75

gag gtt gcc ccg ggg ctg ggc gag acc ctt gcc gct ggc acc cgc ggc 287  
Glu Val Ala Pro Gly Leu Gly Glu Thr Leu Ala Ala Gly Thr Arg Gly  
80 85 90 95

acc ccg tgg cgt ctc tcc tgc gac aag ttc gac acc gac gtc gcc acc 335  
Thr Pro Trp Arg Leu Ser Cys Asp Lys Phe Asp Thr Asp Val Ala Thr  
100 105 110

ctg gcc ttc gcc aac ttc agt gag gag atg cgg gtg ctc ggc tcg ggc 383  
Leu Ala Phe Ala Asn Phe Ser Glu Glu Met Arg Val Leu Gly Ser Gly  
115 120 125

ccc gcc gac ggc gag gtg gtg agg ctc act gtc gac tac agc acg aag 431  
Pro Ala Asp Gly Glu Val Val Arg Leu Thr Val Asp Tyr Ser Thr Lys  
130 135 140

ctg ctc tcc gtc gac agg acc ttc agg cag aag ttc ggt cag cgg ctg 479  
 Leu Leu Ser Val Asp Arg Thr Phe Arg Gln Lys Phe Gly Gln Arg Leu  
 145 150 155  
 gcc gcc gtg ggg cag tac ctg gag cag agg ttc ggg agc gcc cag gac 527  
 Ala Ala Val Gly Gln Tyr Leu Glu Gln Arg Phe Gly Ser Ala Gln Asp  
 160 165 170 175  
 gtg gag ggc tgc atg gtc tgg gaa gac atc tac ata gtg cag agc atg 575  
 Val Glu Gly Cys Met Val Trp Glu Asp Ile Tyr Ile Val Gln Ser Met  
 180 185 190  
 cca caa ccg ctg tag agtcatccgt aataatgttt agatgagcaa agtttttggtt 630  
 Pro Gln Pro Leu  
 195  
 ggtgaaataa aatttgccga aaatcccatg gcaaaataag tcaggtatga agagcccgcc 690  
 tgcgaaacca actgattcta aataatgttt tgaattcgtg tttaaattat gggacgtgaa 750  
 caatgatttc cttggaatgc atgcattgta agttttaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa 807

<210> 10  
 <211> 195  
 <212> PRT  
 <213> Hordeum vulgare

<400> 10

Ala Arg Gly Val Leu Pro Asn Val Ser Leu Ser Asp Pro Thr Asn Phe  
 1 5 10 15

Gly Ser Ala Val Ala Arg Val Trp Ala Ser Leu Tyr Thr Arg Arg Ala  
 20 25 30

Ile Leu Ser Arg Arg Val Ala Gly Val Pro Gln Arg Asp Ala Lys Met  
 35 40 45

Ala Val Leu Val Gln Glu Met Leu Glu Pro Glu Leu Ser Phe Val Leu  
 50 55 60

His Thr Val Ser Pro Ser Asp His Asp Thr Arg Val Val Glu Ala Glu  
 65 70 75 80

Val Ala Pro Gly Leu Gly Glu Thr Leu Ala Ala Gly Thr Arg Gly Thr  
 85 90 95

Pro Trp Arg Leu Ser Cys Asp Lys Phe Asp Thr Asp Val Ala Thr Leu  
 100 105 110

Ala Phe Ala Asn Phe Ser Glu Glu Met Arg Val Leu Gly Ser Gly Pro  
115 120 125

Ala Asp Gly Glu Val Val Arg Leu Thr Val Asp Tyr Ser Thr Lys Leu  
130 135 140

Leu Ser Val Asp Arg Thr Phe Arg Gln Lys Phe Gly Gln Arg Leu Ala  
145 150 155 160

Ala Val Gly Gln Tyr Leu Glu Gln Arg Phe Gly Ser Ala Gln Asp Val  
165 170 175

Glu Gly Cys Met Val Trp Glu Asp Ile Tyr Ile Val Gln Ser Met Pro  
180 185 190

Gln Pro Leu  
195

<210> 11  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Solanum tuberosum

<400> 11

Pro Glu Glu Cys Lys Ala Val Gly Asn  
1 5

<210> 12  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Solanum tuberosum

<400> 12

Thr Glu Glu Tyr Ser Glu Thr  
1 5

<210> 13  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Solanum tuberosum

<400> 13

Arg Phe Val Asn Ala Val Glu  
1 5

<210> 14  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Solanum tuberosum

<400> 14

Glu Gly Ser Glu Asp Gly Lys  
 1 5

<210> 15  
 <211> 403  
 <212> DNA  
 <213> Solanum tuberosum

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(402)  
 <223>

<400> 15 48  
 gcg gat gct tca ata gct atg cgt cag aag tgg cgt ctc tgc gaa atc  
 Ala Asp Ala Ser Ile Ala Met Arg Gln Lys Trp Arg Leu Cys Glu Ile  
 1 5 10 15

ggg ctt gaa gac tat gca ttt gtt ctt ttg agc agg ttt gtg aat gca 96  
 Gly Leu Glu Asp Tyr Ala Phe Val Leu Leu Ser Arg Phe Val Asn Ala  
 20 25 30

gtt gaa gct cta ggc gga gct gat tgg ctt gca gag aat gta aca gtg 144  
 Val Glu Ala Leu Gly Gly Ala Asp Trp Leu Ala Glu Asn Val Thr Val  
 35 40 45

aaa aac att agt tct tgg aat gat cca att gga gca ctt aca gtt gga 192  
 Lys Asn Ile Ser Ser Trp Asn Asp Pro Ile Gly Ala Leu Thr Val Gly  
 50 55 60

atc caa cag cta ggt ata tct ggt tgg aag ccc gag gaa tgc aaa gct 240  
 Ile Gln Gln Leu Gly Ile Ser Gly Trp Lys Pro Glu Glu Cys Lys Ala  
 65 70 75 80

gtt gga aat gaa ctt ttg tca tgg aaa gaa agg ggt att tca gaa att 288  
 Val Gly Asn Glu Leu Leu Ser Trp Lys Glu Arg Gly Ile Ser Glu Ile  
 85 90 95

gaa ggc agc gaa gat ggt aag act ata tgg gca tta aga cta aaa gcg 336  
 Glu Gly Ser Glu Asp Gly Lys Thr Ile Trp Ala Leu Arg Leu Lys Ala  
 100 105 110

act ctt gat aga agt cga agg tta act gag gag tat tcc gag aca ctt 384  
 Thr Leu Asp Arg Ser Arg Arg Leu Thr Glu Glu Tyr Ser Glu Thr Leu  
 115 120 125

ctc caa ata ttc cct gaa a  
 Leu Gln ile Phe Pro Glu  
 130

<210> 16  
 <211> 134  
 <212> PRT  
 <213> Solanum tuberosum

<400> 16

Ala Asp Ala Ser ile Ala Met Arg Gln Lys Trp Arg Leu Cys Glu ile  
 1 5 10 15

Gly Leu Glu Asp Tyr Ala Phe Val Leu Leu Ser Arg Phe Val Asn Ala  
 20 25 30

Val Glu Ala Leu Gly Gly Ala Asp Trp Leu Ala Glu Asn Val Thr Val  
 35 40 45

Lys Asn ile Ser Ser Trp Asn Asp Pro ile Gly Ala Leu Thr Val Gly  
 50 55 60

ile Gln Gln Leu Gly ile Ser Gly Trp Lys Pro Glu Glu Cys Lys Ala  
 65 70 75 80

Val Gly Asn Glu Leu Leu Ser Trp Lys Glu Arg Gly ile Ser Glu ile  
 85 90 95

Glu Gly Ser Glu Asp Gly Lys Thr ile Trp Ala Leu Arg Leu Lys Ala  
 100 105 110

Thr Leu Asp Arg Ser Arg Arg Leu Thr Glu Glu Tyr Ser Glu Thr Leu  
 115 120 125

Leu Gln ile Phe Pro Glu  
 130

<210> 17  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Sorghum bicolor

<400> 17

Asp Gly Gly His His Arg Pro  
 1 5



<210> 18  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Sorghum bicolor

<400> 18

Asp Ala Pro Asp Ser Ala Ile Ala  
1 5

<210> 19  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Sorghum bicolor

<400> 19

Ile Pro Glu Asn Ser Val Arg Thr Tyr  
1 5

<210> 20  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Sorghum bicolor

<400> 20

Val Asn Lys Ala Asp Gly  
1 5

<210> 21  
<211> 1526  
<212> DNA  
<213> Sorghum bicolor

<220>  
<221> CDS  
<222> (2)..(1525)  
<223>

<400> 21  
g cac gag gct gaa tat gtt cat gat cag agt cac ctg gag gct ctt aca 49  
His Glu Ala Glu Tyr Val His Asp Gln Ser His Leu Glu Ala Leu Thr  
1 5 10 15  
tat tct gca ata tat cta aag tgg ata tat act ggt caa ata cca tgc 97  
Tyr Ser Ala Ile Tyr Leu Lys Trp Ile Tyr Thr Gly Gln Ile Pro Cys  
20 25 30  
ttt gag gat ggt ggt cac cat cga ccc aat aaa cat gct gag ata tcc 145  
Phe Glu Asp Gly Gly His His Arg Pro Asn Lys His Ala Glu Ile Ser

35	40	45	
agg caa att ttt cgt gaa att gaa agg ata tac tat ggg gaa aac aca			193
Arg Gln Ile Phe Arg Glu Ile Glu Arg Ile Tyr Tyr Gly Glu Asn Thr			
50	55	60	
tca gct cag gat ttg ctt gtg ata cgc aag att cat cct tgt cta cct			241
Ser Ala Gln Asp Leu Leu Val Ile Arg Lys Ile His Pro Cys Leu Pro			
65	70	75	80
tca ttt aaa tca gaa ttt act gcc tct gtt cct cta aca cga att cgt			289
Ser Phe Lys Ser Glu Phe Thr Ala Ser Val Pro Leu Thr Arg Ile Arg			
85	90	95	
gat att gct cat cgt aat gac ata cca cat gat ctc aag caa gaa atc			337
Asp Ile Ala His Arg Asn Asp Ile Pro His Asp Leu Lys Gln Glu Ile			
100	105	110	
aag cat act ata caa aac aag ctt cac cgg aat gcc ggc cct gag gat			385
Lys His Thr Ile Gln Asn Lys Leu His Arg Asn Ala Gly Pro Glu Asp			
115	120	125	
ctt att gct act gaa gcc atg ctt gct agg att act aag act cct gga			433
Leu Ile Ala Thr Glu Ala Met Leu Ala Arg Ile Thr Lys Thr Pro Gly			
130	135	140	
gag tac agt gaa gct ttt gtt gaa caa ttc aag acg ttt tat agt gaa			481
Glu Tyr Ser Glu Ala Phe Val Glu Gln Phe Lys Thr Phe Tyr Ser Glu			
145	150	155	160
tta aaa gat ttc ttc aat gct ggc agc cta ctg gag caa gtg caa tcc			529
Leu Lys Asp Phe Phe Asn Ala Gly Ser Leu Leu Glu Gln Val Gln Ser			
165	170	175	
atc gag caa tct ttg gat gag tct ggc tta gaa gct ctc tca tcc ttt			577
Ile Glu Gln Ser Leu Asp Glu Ser Gly Leu Glu Ala Leu Ser Ser Phe			
180	185	190	
ctg aaa acc aaa aag aat tta gac caa ctg gaa gat gca aaa gat ttg			625
Leu Lys Thr Lys Lys Asn Leu Asp Gln Leu Glu Asp Ala Lys Asp Leu			
195	200	205	
gat gaa aat ggt ggc gtt caa gtt ttg ttg aaa gcc ttg ctg tcg tta			673
Asp Glu Asn Gly Gly Val Gln Val Leu Leu Lys Ala Leu Leu Ser Leu			
210	215	220	
tct tat cta aga tca att cta atg aag ggt ctg gaa agt ggc ctt aga			721
Ser Tyr Leu Arg Ser Ile Leu Met Lys Gly Leu Glu Ser Gly Leu Arg			
225	230	235	240
aat gat gct cca gat agt gct att gca atg cga caa aag tgg cgt ctt			769
Asn Asp Ala Pro Asp Ser Ala Ile Ala Met Arg Gln Lys Trp Arg Leu			
245	250	255	
tgt gag atc ggg ctt gaa gat tat tcg ttt gta ttg tta agt aga tac			817
Cys Glu Ile Gly Leu Glu Asp Tyr Ser Phe Val Leu Leu Ser Arg Tyr			
260	265	270	

atc aat gct ctt gaa gct ttg ggt gga tca gct tca ctt gca gag ggt Ile Asn Ala Leu Glu Ala Leu Gly Gly Ser Ala Ser Leu Ala Glu Gly 275 280 285	865
ctt cct aca aat aca agt cta tgg gat gat gcc ctt gat gcc ctt gtc Leu Pro Thr Asn Thr Ser Leu Trp Asp Asp Ala Leu Asp Ala Leu Val 290 295 300	913
att ggc ata aat caa gtt agc ttt tca gga tgg aaa cca aat gag tgt Ile Gly Ile Asn Gln Val Ser Phe Ser Gly Trp Lys Pro Asn Glu Cys 305 310 315 320	961
act gca ata gtg aat gag ctt ctt tct tgg aag cag aaa ggt cta tct Thr Ala Ile Val Asn Glu Leu Leu Ser Trp Lys Gln Lys Gly Leu Ser 325 330 335	1009
gaa ttt gaa ggc agt gag gat gga aag tat att tgg gca ctg aga ctc Glu Phe Glu Gly Ser Glu Asp Gly Lys Tyr Ile Trp Ala Leu Arg Leu 340 345 350	1057
aaa gcc act ctt gat aga tca cga aga cta aca gaa gaa tac tct gaa Lys Ala Thr Leu Asp Arg Ser Arg Arg Leu Thr Glu Glu Tyr Ser Glu 355 360 365	1105
gca ctt ctt tct ata ttt cct gaa aaa gtc aag gtt ctt ggg aaa gcc Ala Leu Leu Ser Ile Phe Pro Glu Lys Val Lys Val Leu Gly Lys Ala 370 375 380	1153
ctt gga ata cca gag aac agt gtg aga aca tac act gaa gct gaa att Leu Gly Ile Pro Glu Asn Ser Val Arg Thr Tyr Thr Glu Ala Glu Ile 385 390 395 400	1201
cgt gct ggt gtt att ttt cac gtc tcg aaa ctt tgc act gta ctt tta Arg Ala Gly Val Ile Phe His Val Ser Lys Leu Cys Thr Val Leu Leu 405 410 415	1249
aaa gca act cga gca gtt ctt gga tcg tct gtg tgg gat gtt ctt gtt Lys Ala Thr Arg Ala Val Leu Gly Ser Ser Val Trp Asp Val Leu Val 420 425 430	1297
cct gga gtg gcc cat gga gcc ttg ata cag gtt gaa aga ata gct cct Pro Gly Val Ala His Gly Ala Leu Ile Gln Val Glu Arg Ile Ala Pro 435 440 445	1345
gga tca ttg cca tca tcc atc aaa gaa cct gtc gtg cta gtt gta aac Gly Ser Leu Pro Ser Ser Ile Lys Glu Pro Val Val Leu Val Val Asn 450 455 460	1393
aag gct gat gga gat gaa gag gtc aaa gct gct ggg gat aac ata gtg Lys Ala Asp Gly Asp Glu Glu Val Lys Ala Ala Gly Asp Asn Ile Val 465 470 475 480	1441
ggt gtt att ctt cta caa gaa tta cct cac cta tca cat ctt ggt gtt Gly Val Ile Leu Leu Gln Glu Leu Pro His Leu Ser His Leu Gly Val 485 490 495	1489

aga gct cgt caa gag aaa gtt gta ttt gta act tgc g  
Arg Ala Arg Gln Glu Lys Val Val Phe Val Thr Cys  
500 505

1526

<210> 22  
<211> 508  
<212> PRT  
<213> Sorghum bicolor

<400> 22

His Glu Ala Glu Tyr Val His Asp Gln Ser His Leu Glu Ala Leu Thr  
1 5 10 15

Tyr Ser Ala Ile Tyr Leu Lys Trp Ile Tyr Thr Gly Gln Ile Pro Cys  
20 25 30

Phe Glu Asp Gly Gly His His Arg Pro Asn Lys His Ala Glu Ile Ser  
35 40 45

Arg Gln Ile Phe Arg Glu Ile Glu Arg Ile Tyr Tyr Gly Glu Asn Thr  
50 55 60

Ser Ala Gln Asp Leu Leu Val Ile Arg Lys Ile His Pro Cys Leu Pro  
65 70 75 80

Ser Phe Lys Ser Glu Phe Thr Ala Ser Val Pro Leu Thr Arg Ile Arg  
85 90 95

Asp Ile Ala His Arg Asn Asp Ile Pro His Asp Leu Lys Gln Glu Ile  
100 105 110

Lys His Thr Ile Gln Asn Lys Leu His Arg Asn Ala Gly Pro Glu Asp  
115 120 125

Leu Ile Ala Thr Glu Ala Met Leu Ala Arg Ile Thr Lys Thr Pro Gly  
130 135 140

Glu Tyr Ser Glu Ala Phe Val Glu Gln Phe Lys Thr Phe Tyr Ser Glu  
145 150 155 160

Leu Lys Asp Phe Phe Asn Ala Gly Ser Leu Leu Glu Gln Val Gln Ser  
165 170 175

Ile Glu Gln Ser Leu Asp Glu Ser Gly Leu Glu Ala Leu Ser Ser Phe

180

185

190

Leu Lys Thr Lys Lys Asn Leu Asp Gln Leu Glu Asp Ala Lys Asp Leu  
 195 200 205

Asp Glu Asn Gly Gly Val Gln Val Leu Leu Lys Ala Leu Leu Ser Leu  
 210 215 220

Ser Tyr Leu Arg Ser Ile Leu Met Lys Gly Leu Glu Ser Gly Leu Arg  
 225 230 235 240

Asn Asp Ala Pro Asp Ser Ala Ile Ala Met Arg Gln Lys Trp Arg Leu  
 245 250 255

Cys Glu Ile Gly Leu Glu Asp Tyr Ser Phe Val Leu Leu Ser Arg Tyr  
 260 265 270

Ile Asn Ala Leu Glu Ala Leu Gly Gly Ser Ala Ser Leu Ala Glu Gly  
 275 280 285

Leu Pro Thr Asn Thr Ser Leu Trp Asp Asp Ala Leu Asp Ala Leu Val  
 290 295 300

Ile Gly Ile Asn Gln Val Ser Phe Ser Gly Trp Lys Pro Asn Glu Cys  
 305 310 315 320

Thr Ala Ile Val Asn Glu Leu Leu Ser Trp Lys Gln Lys Gly Leu Ser  
 325 330 335

Glu Phe Glu Gly Ser Glu Asp Gly Lys Tyr Ile Trp Ala Leu Arg Leu  
 340 345 350

Lys Ala Thr Leu Asp Arg Ser Arg Arg Leu Thr Glu Glu Tyr Ser Glu  
 355 360 365

Ala Leu Leu Ser Ile Phe Pro Glu Lys Val Lys Val Leu Gly Lys Ala  
 370 375 380

Leu Gly Ile Pro Glu Asn Ser Val Arg Thr Tyr Thr Glu Ala Glu Ile  
 385 390 395 400

Arg Ala Gly Val Ile Phe His Val Ser Lys Leu Cys Thr Val Leu Leu  
 405 410 415

Lys Ala Thr Arg Ala Val Leu Gly Ser Ser Val Trp Asp Val Leu Val  
420 425 430

Pro Gly Val Ala His Gly Ala Leu Ile Gln Val Glu Arg Ile Ala Pro  
435 440 445

Gly Ser Leu Pro Ser Ser Ile Lys Glu Pro Val Val Leu Val Val Asn  
450 455 460

Lys Ala Asp Gly Asp Glu Glu Val Lys Ala Ala Gly Asp Asn Ile Val  
465 470 475 480

Gly Val Ile Leu Leu Gln Glu Leu Pro His Leu Ser His Leu Gly Val  
485 490 495

Arg Ala Arg Gln Glu Lys Val Val Phe Val Thr Cys  
500 505

<210> 23  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Triticum aestivum

<400> 23

Arg Asn Asp Ala Thr Asp Ala Gly  
1 5

<210> 24  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Triticum aestivum

<400> 24

Gly Asn Thr Ser Val Trp Asp Asp  
1 5

<210> 25  
<211> 509  
<212> DNA  
<213> Triticum aestivum

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(507)  
<223>



<400> 25  
aat ggc gct ttt gtc gaa caa ttt caa ata ttt tat agc gaa cta aaa 48  
Asn Gly Ala Phe Val Glu Gln Phe Gln Ile Phe Tyr Ser Glu Leu Lys  
1 5 10 15  
gac ttc ttt aat gcc ggc agc ctg ttt gaa caa ctg gaa tcc atc aag 96  
Asp Phe Phe Asn Ala Gly Ser Leu Phe Glu Gln Leu Glu Ser Ile Lys  
20 25 30  
gaa tct ttg aat gat tct ggc tta gaa gca ctg tca tca ttt gtc aaa 144  
Glu Ser Leu Asn Asp Ser Gly Leu Glu Ala Leu Ser Ser Phe Val Lys  
35 40 45  
acc aaa cag agt ttg gac caa gtg gat gct gcg aac att caa gtt gtg 192  
Thr Lys Gln Ser Leu Asp Gln Val Asp Ala Ala Asn Ile Gln Val Val  
50 55 60  
atg aag acc ttg cag tca ttg tct tca ttg aga tca gtt cta atg aag 240  
Met Lys Thr Leu Gln Ser Leu Ser Ser Leu Arg Ser Val Leu Met Lys  
65 70 75 80  
ggc ctt gaa agt ggc ctt aga aat gat gcg act gat gcc ggt ata gca 288  
Gly Leu Glu Ser Gly Leu Arg Asn Asp Ala Thr Asp Ala Gly Ile Ala  
85 90 95  
atg cga caa aag tgg cgc ctt tgt gag att ggt ctt gag gat tat tct 336  
Met Arg Gln Lys Trp Arg Leu Cys Glu Ile Gly Leu Glu Asp Tyr Ser  
100 105 110  
ttt gtt ttg tta agc aga tat atc aat ggt ctt gaa gct tca ggt gga 384  
Phe Val Leu Leu Ser Arg Tyr Ile Asn Gly Leu Glu Ala Ser Gly Gly  
115 120 125  
tca gct tca ctt gca caa tgt gtg gct gga aat aca agt gta tgg gac 432  
Ser Ala Ser Leu Ala Gln Cys Val Ala Gly Asn Thr Ser Val Trp Asp  
130 135 140  
gat acc ctt gat gcc ctt att att ggc gtc aat caa gtt agc ttt tca 480  
Asp Thr Leu Asp Ala Leu Ile Ile Gly Val Asn Gln Val Ser Phe Ser  
145 150 155 160  
ggt tgg aag cca gag gaa tgc att gct at 509  
Gly Trp Lys Pro Glu Glu Cys Ile Ala  
165

<210> 26  
<211> 169  
<212> PRT  
<213> Triticum aestivum

<400> 26

Asn Gly Ala Phe Val Glu Gln Phe Gln Ile Phe Tyr Ser Glu Leu Lys  
1 5 10 15

Asp Phe Phe Asn Ala Gly Ser Leu Phe Glu Gln Leu Glu Ser Ile Lys  
20 25 30

Glu Ser Leu Asn Asp Ser Gly Leu Glu Ala Leu Ser Ser Phe Val Lys  
35 40 45

Thr Lys Gln Ser Leu Asp Gln Val Asp Ala Ala Asn Ile Gln Val Val  
50 55 60

Met Lys Thr Leu Gln Ser Leu Ser Ser Leu Arg Ser Val Leu Met Lys  
65 70 75 80

Gly Leu Glu Ser Gly Leu Arg Asn Asp Ala Thr Asp Ala Gly Ile Ala  
85 90 95

Met Arg Gln Lys Trp Arg Leu Cys Glu Ile Gly Leu Glu Asp Tyr Ser  
100 105 110

Phe Val Leu Leu Ser Arg Tyr Ile Asn Gly Leu Glu Ala Ser Gly Gly  
115 120 125

Ser Ala Ser Leu Ala Gln Cys Val Ala Gly Asn Thr Ser Val Trp Asp  
130 135 140

Asp Thr Leu Asp Ala Leu Ile Ile Gly Val Asn Gln Val Ser Phe Ser  
145 150 155 160

Gly Trp Lys Pro Glu Glu Cys Ile Ala  
165

1/5

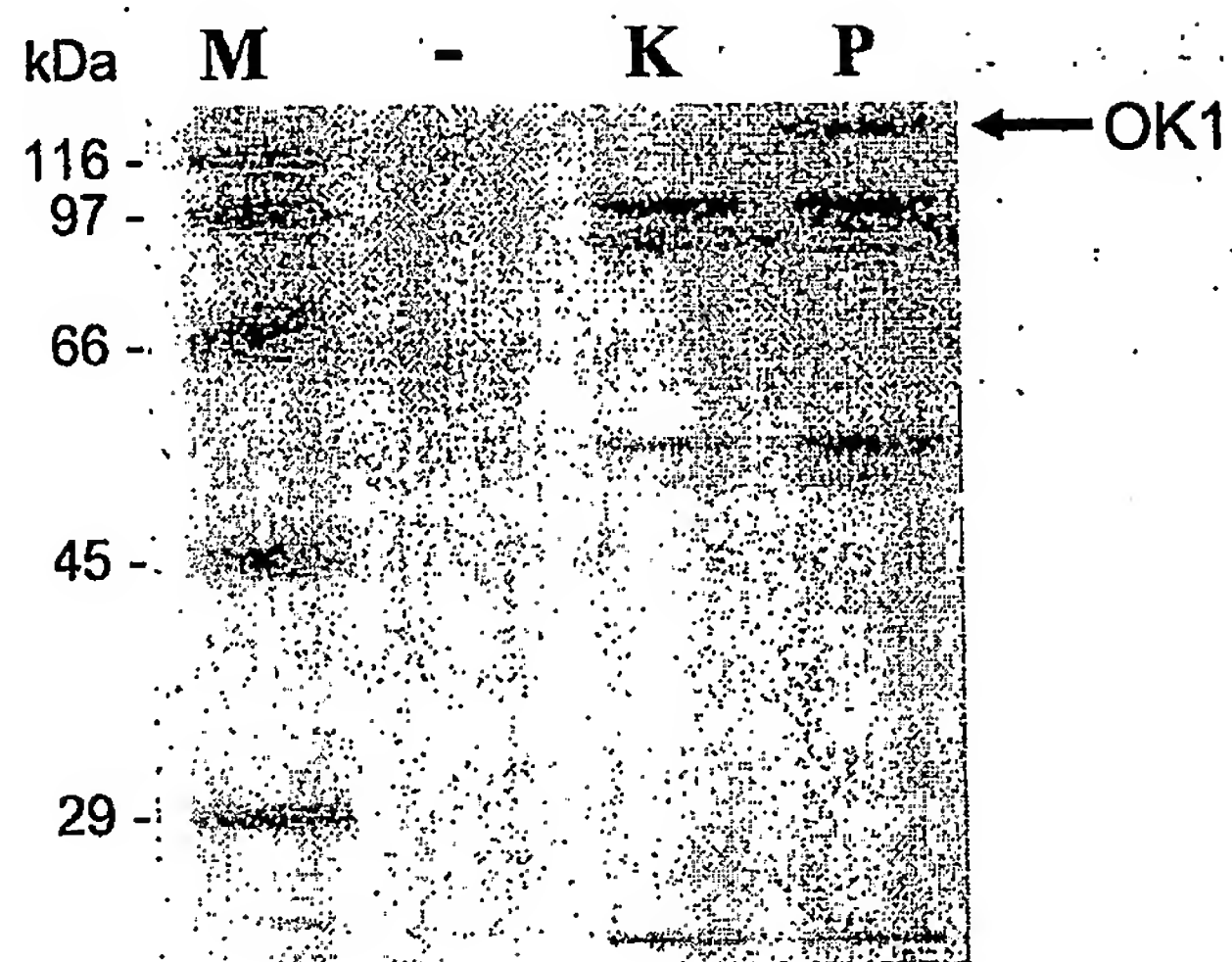


Fig. 1

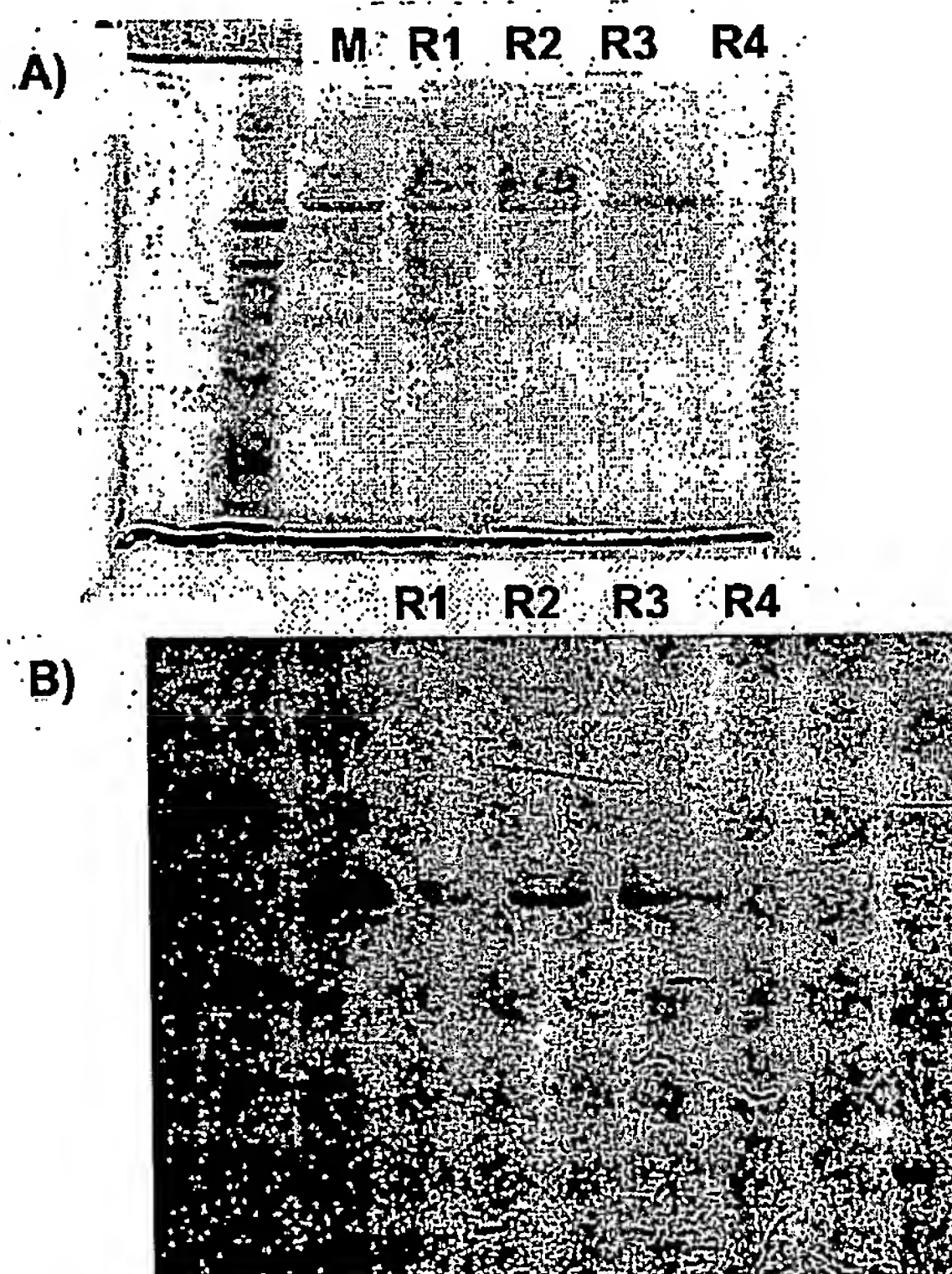


Fig. 2

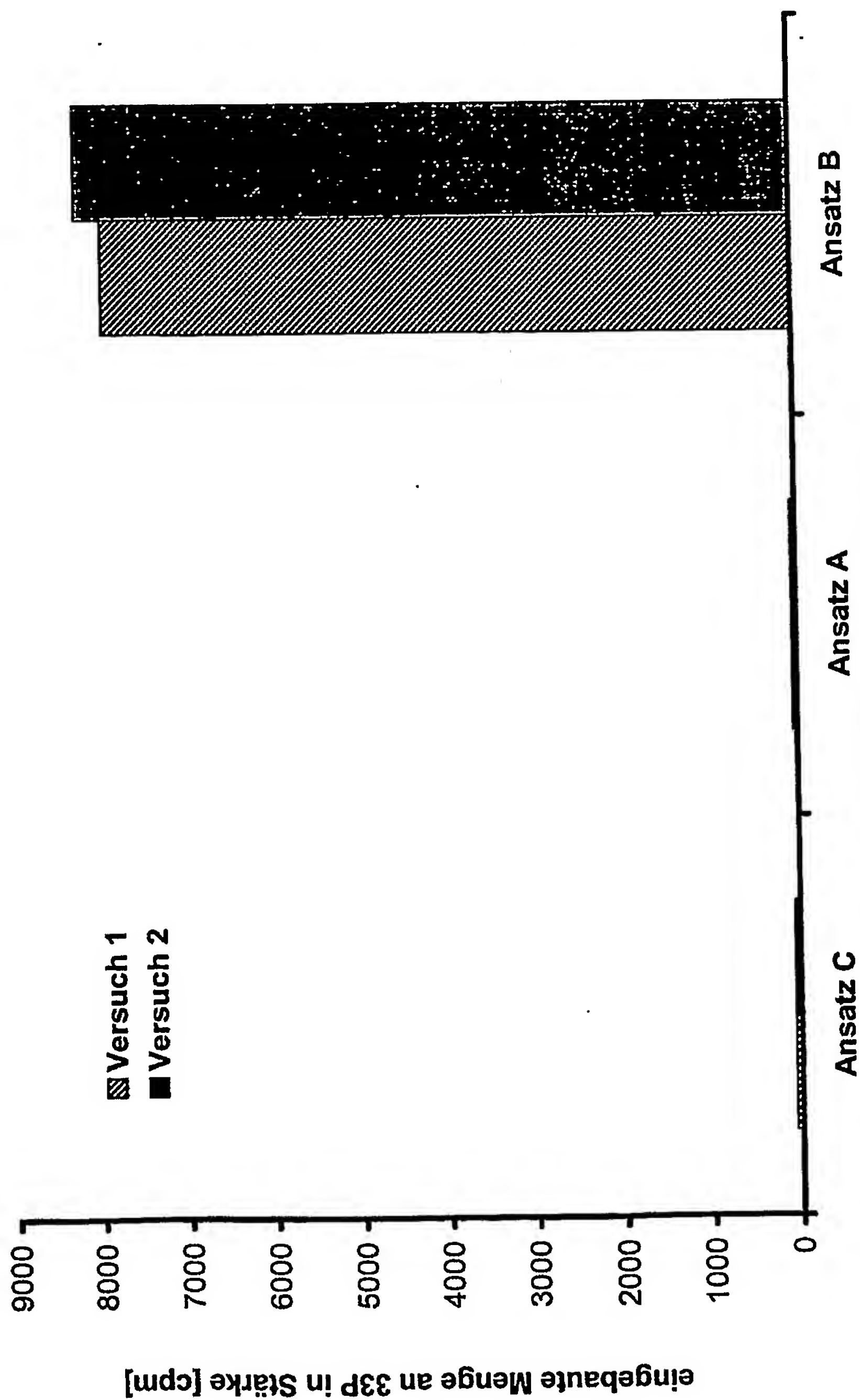


Fig.: 3

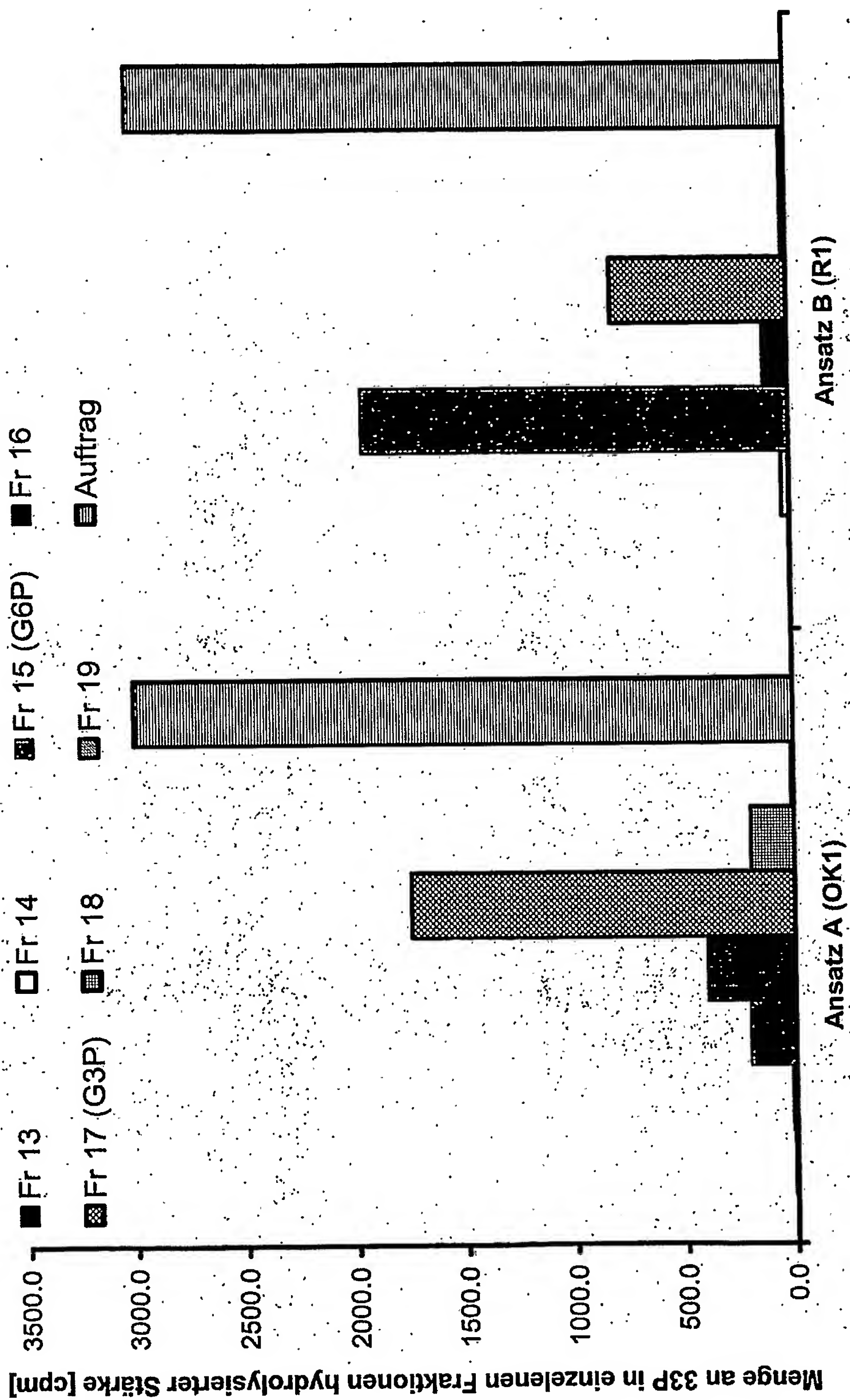


Fig. 4

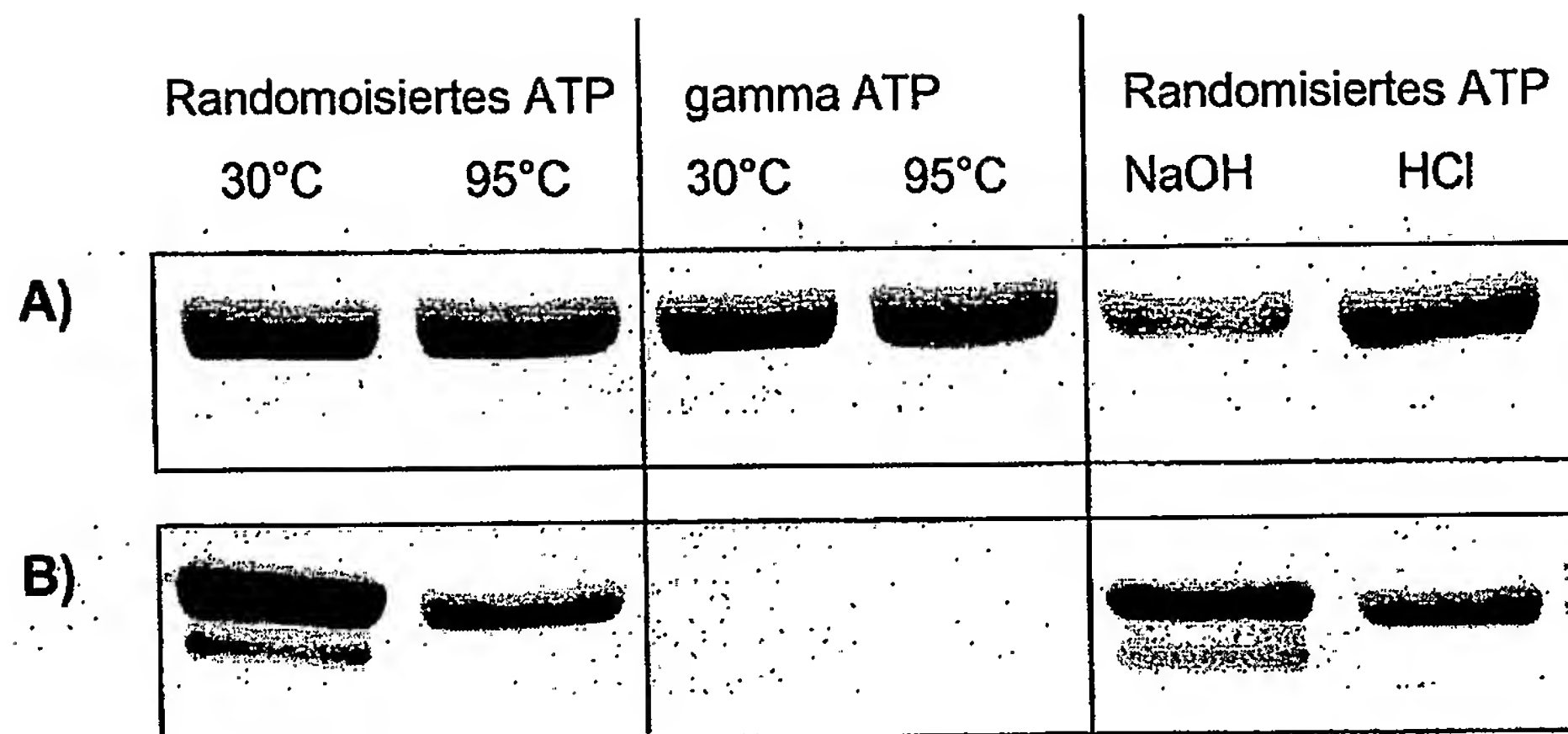


Fig. 5



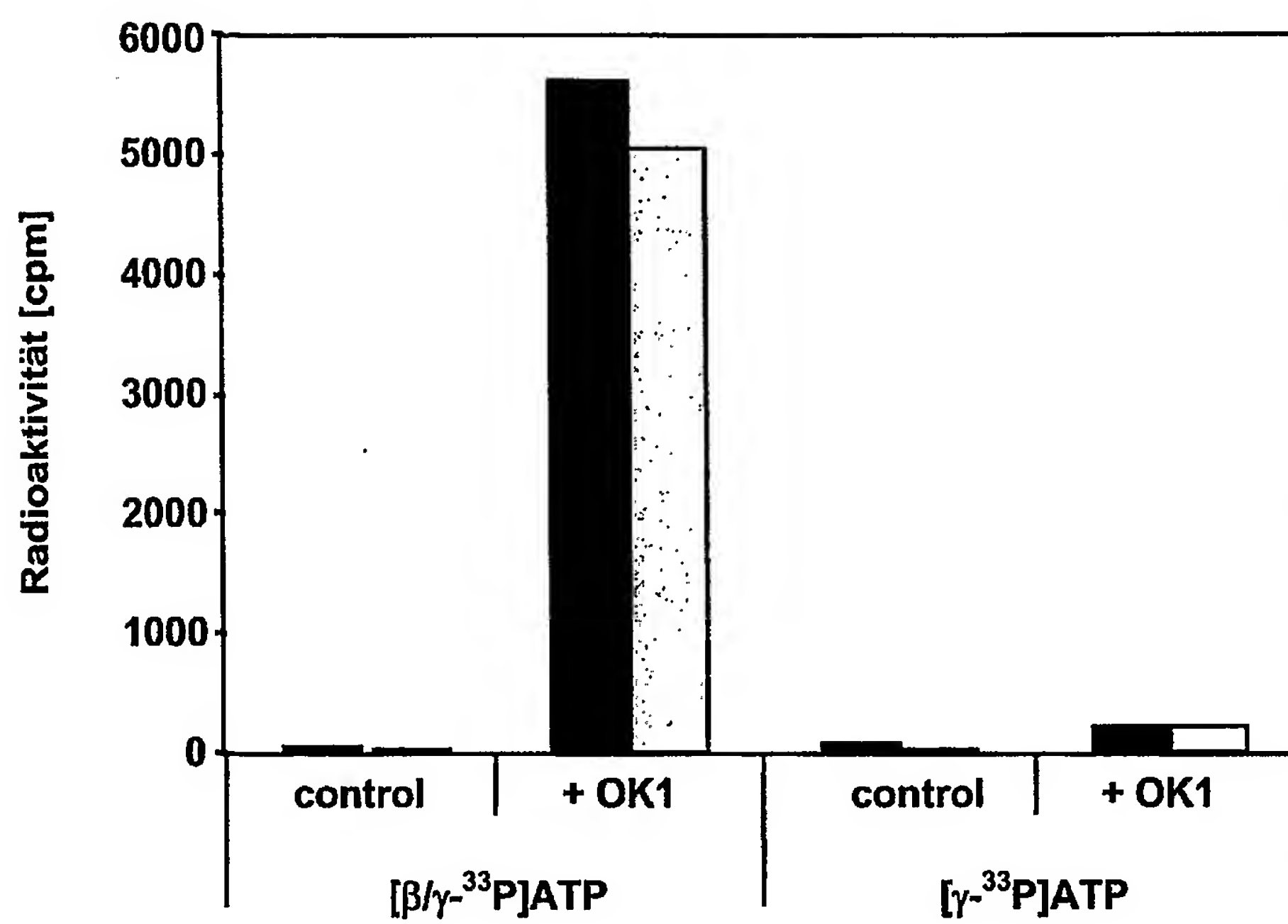


Fig. 6